N° d'ordre

64

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Eugène NEUZIL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES
DOCTEUR EN MÉDECINE
ASSISTANT CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Paris, le 9 Juin 1921.

1re Thèse. — CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES NON IONISÉES.

2e Thèse. — LA THYROÏDE : PHYSIOLOGIE ET BIOGÉNÈSE DE SON HORMONE.

Soutenues le 9 Octobre 1952, devant la Commission d'Examen.

MM. CALAS, professeur ..... *Président*
BOUNHIOL, professeur. .....
DAVID, professeur ..... *Examinateurs*
TAYEAU, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie.

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1954

N° d'ordre

64

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Eugène NEUZIL

LICENCIÉ ÈS SCIENCES
DOCTEUR EN MÉDECINE
ASSISTANT CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Né à Paris, le 9 Juin 1921.

1re Thèse. — CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES NON IONISÉES.

2e Thèse. — LA THYROÏDE : PHYSIOLOGIE ET BIOGÉNÈSE DE SON HORMONE.

Soutenues le 9 Octobre 1952, devant la Commission d'Examen.

MM. CALAS, professeur ..... *Président*
BOUNHIOL, professeur ..... } *Examinateurs*
DAVID, professeur ..... }
TAYEAU, professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie. }

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3
—
1954

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen ..... BRUS

Doyens honoraires..
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'EcoleNormale Supérieure.
- CHAINE
- MERCIER

Professeurs honoraires .....
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- BOUNHIOL
- DEVAUX ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'Ecole Normale Supérieure.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DAURE ..... Recteur de l'Académie de Caen.
- CHAINE
- KASTLER ..... Professeur à la Sorbonne.
- QUELET..... Professeur à la Sorbonne.

Professeurs .....
- MERCIER..... Radio-électricité.
- MILLOUX..... Calcul infinitésimal.
- DANGEARD..... Botanique.
- GÉNEVOIS..... Chimie biologique et Physiologie végétale.
- CAU..... Physique expérimentale.
- BRUS..... Chimie.
- AVEL..... Zoologie et Physiologie animale.
- ROUSSET..... Physique générale.
- ROGER..... Mécanique rationnelle.
- WEILL..... Anatomie comparée et Embryogénie.
- SERVANT..... Physique.
- DUFRESNOY..... Mathématiques générales.
- BOUNHIOL..... Biologie animale.
- PISOT..... Calcul des probabilités.
- DAVID..... Biologie végétale.
- GAY..... Minéralogie.
- SCHOELLER..... Géologie.
- CALAS..... Chimie organique.
- ALLARD..... Chimie.
- GUIZONNIER..... Physique.
- LAMARE..... Géologie.
- COLMEZ..... Mathématiques.
- PATY..... Chimie.
- PACAULT..... Chimie minérale et Chimie physique.

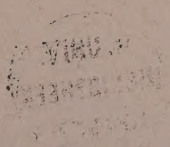
Maîtres de conférences honoraires.
- ARRIVAUT
- DE PUYMALY

Maîtres de conférences .....
- MALVESIN-FABRE. Botanique.
- CAMBAR..... Biologie générale.
- RIBEREAU-GAYON Œnologie et Chimie agricole.
- Mlle JOSIEN..... Chimie minérale.
- VIGNEAUX..... Géologie.

Secrétaire principal. ARTIGUELONG

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES NON IONISÉES



CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES NON IONISÉES

AVANT-PROPOS

On aurait pu s'étonner, il n'y a pas encore si longtemps, de voir la recherche médicale s'orienter vers l'étude physico-chimique et biologique de produits primitivement destinés au lavage et à l'ensimage des laines. Ceci ne doit plus nous surprendre aujourd'hui.

Depuis le début du siècle, en effet, l'essor considérable de jeunes disciplines, biochimie et physico-chimie biologique en particulier, ont élargi les horizons traditionnels de la science médicale. La morphologie, d'abord anatomique, puis histologique et enfin cytologique, s'attache maintenant à décrire la structure moléculaire des principes immédiats dont les interactions réciproques fournissent par leur intégration le substratum de la physiologie classique : « une γ-globuline de 240 Å de grand axe » nous est devenu aussi familier que « deux travers de doigt au-dessous du creux poplité. »

Tandis que cette évolution se poursuit, la médecine pénètre chaque jour plus profondément l'industrie, apportant avec elle l'hygiène professionnelle et la prévention; cette incursion s'est révélée être une source d'échanges fructueux dont les biologistes ont rapporté non seulement des vues nouvelles sur les intoxications par exemple, mais encore de nouveaux produits permettant d'intéressantes applications thérapeutiques. Les résines acryliques constituent un matériau également propre à confectionner le cockpit des avions de chasse et les os artificiels. Les mêmes échangeurs d'ions servent aujourd'hui à empêcher l'entartrage des chaudières et l'hyperchlorhydrie de l'ulcus gastrique.

Dès notre arrivée au Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale, en 1943, notre intérêt fut éveillé par les substances possédant une activité de surface, dont notre Maître, le Professeur F. Tayeau, avait, les années précédentes, étudié le mode d'action sur les cénapses lipidoprotéidiques.

Nous appliquâmes bientôt ses techniques utilisant les saponosides pour résoudre quelques problèmes immunologiques concernant la réaction de précipitation antigène-anticorps. Lorsqu'en 1946, M. le Professeur Polonovski nous accueillit dans son Laboratoire de Recherches, nous trouvâmes, en étudiant sous sa direction la xanthine-déhydrase du lait, un nouveau système sur lequel l'action biologique des agents superficiellement actifs se montre particulièrement nette. Quelques journées passées en compagnie du Professeur Henri Devaux qui répéta pour nous, dans son Laboratoire, ses expériences les plus célèbres et les plus démonstratives, achevèrent, s'il en était besoin, de nous convaincre de l'intérêt primordial des phénomènes de surface dans la structure et la vie cellulaires.

Malgré le nombre considérable de publications consacrées aux agents superficiellement actifs et particulièrement à leur comportement physico-chimique ou biologique, nous avons constaté que ce domaine de recherches était loin d'être épuisé. Les agents non ionisés dérivés de l'anhydride de sorbitol, ou tweens, les derniers venus dans le domaine des détergents de synthèse, sont connus des biologistes depuis les travaux de Dubos, mais n'ont donné lieu jusqu'ici qu'à un nombre assez restreint de recherches. Notre but sera atteint si notre travail, lui-même obligatoirement assez limité, en montrant certaines propriétés inédites de ces composés, les fait mieux connaître et peut servir de départ à de nouvelles investigations.

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale de la Faculté de Médecine de Bordeaux et au Centre de Recherches de Biologie Préventive de la Caisse Régionale de Sécurité Sociale. Dans ces deux Laboratoires, nous avons bénéficié des conseils éclairés de M. le Professeur Tayeau à qui nous devons tant : après nous avoir, par son exemple, inculqué l'esprit de recherche, il a dirigé nos premiers travaux et, depuis, suivi avec le plus grand intérêt l'évolution de nos recherches. Qu'il veuille bien trouver ici nos sentiments de sincère reconnaissance pour son amicale et constante sollicitude à notre égard.

Nous avons toujours trouvé auprès de M. le Professeur David l'accueil le plus chaleureux : il nous a fait part de ses vastes connaissances et du résultat de ses travaux originaux concernant le phénomène si complexe de la germination. Nous lui adressons nos plus vifs remerciements.

M. le Professeur Blanquet a mis à notre disposition, tant à la Faculté de Médecine qu'à la Fondation Bergonié, des outils de recherche modernes. Son expérience personnelle et ses conseils nous ont été particulièrement précieux. Nous l'assurons de toute notre gratitude.

M. le Professeur Mayer nous a guidé de ses conseils pour l'expérimentation animale. Nous lui sommes également redevable de nombreux examens histologiques dont nous le remercions très cordialement.

Nos remerciements vont également à nos camarades qui nous ont aidé dans la réalisation de certaines expériences : MM. les Docteurs P. Fréour et R. Stoll; M. J. Marquevielle, assistant au Laboratoire de Chimie Biologique; M^lle F. Léglise, MM. R. Jensen et R. Canivenc.

Nous voudrions associer également à cet hommage les auteurs dont les publications nous ont le plus orienté vers l'étude des agents superficiellement actifs, et notamment MM. A. E. Alexander, H. L. Booij, H. G. Bungenberg de Jong, D. G. Dervichian, M. Joly, J. W. Mc Bain, J. Polonovski, E. K. Rideal, J. M. Schulman, H. Veldstra.

Nous nous plaisons, enfin, à remercier l'Administration de la Caisse Régionale de Sécurité Sociale qui, avec une grande largeur de vue, encourage dans ses Laboratoires la réalisation de travaux de recherche scientifique et qui nous a apporté l'aide matérielle la plus précieuse.

Bordeaux, septembre 1952.

INTRODUCTION

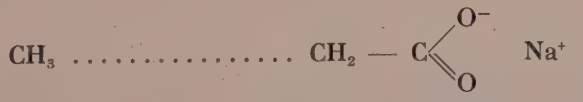
" DES SAVONS AUX TWEENS "

« Une bulle de savon est une belle chose : elle s'adresse à plusieurs sens et à beaucoup de genres d'esprit; elle fait la joie des enfants et nous remplit d'admiration, nous qui savons quelque chose de ces mystères de la physique moléculaire qu'elle contribue pour une grande part à nous révéler. »

C. V. Boys, *Journal de Physique*, 1912, t. 2, p. 611.

Les sels alcalins des acides gras, les savons, depuis leur découverte à la fin de l'Empire Romain et pendant des siècles, ont été, avec les saponines, les seules substances connues et pratiquement utilisées pour leurs propriétés détergentes.

Les cinquante dernières années nous ont apporté une somme considérable de renseignements concernant non seulement la constitution chimique de ces savons, mais, surtout, les propriétés si caractéristiques de leurs solutions aqueuses. Les physico-chimistes, et tout particulièrement J. W. Mc Bain, ont montré que la plupart des phénomènes observés sont en relation étroite avec la structure moléculaire des sels alcalins des acides gras. En effet, lorsqu'on dissout dans l'eau ces dernières substances, elles s'ionisent suivant le schéma ci-dessous et fournissent, à côté du cation métallique, un anion « gras »



qui possède à la fois un groupement carboxylique fortement

hydrophile et une chaîne polyméthylénique paraffinique hydrophobe. A cause de cette double polarité, de ce caractère « amphiphile » ou « amphipathique », les savons ont tendance à s'orienter de manière à permettre aux groupements terminaux de satisfaire leur affinité propre. En solution aqueuse, les anions gras s'accumulent à la surface libre pour former une couche monomoléculaire orientée : leurs groupements polaires, dirigés vers le bas, restent ainsi baignés par l'eau, tandis que les chaînes paraffiniques se tournent vers l'air. Cette concentration en surface modifie considérablement la tension superficielle qui présente, pour les solutions de savons, des valeurs toujours très basses. Les savons représentent le prototype des substances « tensio-actives » ou, mieux, « superficiellement actives » (DERVICHIAN). L'activité de surface des savons est également responsable de la formation de mousses et des phénomènes de mouillabilité. C'est encore à la possibilité d'orientation des molécules de savons qu'est due la formation de micelles, elles-mêmes responsables des propriétés optiques des solutions (effet Tyndall), des phénomènes de solubilisation et d'émulsification (*).

Tandis que se développaient nos connaissances théoriques sur les propriétés physicochimiques des savons, ces détergents se montraient bientôt incapables de répondre à des besoins nouveaux et sans cesse croissants, provenant en majeure partie de l'industrie textile : foulage acide des draps, détersion en présence d'eaux dures, améliorations de la solidité des teintures, etc.

Les huiles sulfonées, utilisées techniquement depuis le milieu du XIX^{e} siècle, constituent le premier exemple de produits destinés à remplacer les savons ordinaires. Mais c'est surtout au cours de la première guerre mondiale que le blocus allié, en privant l'Allemagne de matières grasses, incita les chimistes de ce pays à réaliser la création de nouvelles substances superficiellement actives entièrement synthétiques, dont la production soit indépendante de l'apport des matières premières naturelles traditionnelles. Les chercheurs réalisèrent un grand nombre de composés dont la structure générale était analogue à celle des savons ordinaires : ils n'en différaient que par la nature chimique des groupements hydrophiles et hydro-

(*) On trouvera dans les publications suivantes une étude de la structure et des principales propriétés des solutions de savons [140, 52, 187, 20, 121].

phobes assurant le caractère amphipathique de la molécule. Les résultats obtenus furent souvent si encourageants que, la paix revenue, on vit, dans tous les pays, un essor considérable des recherches dans ce domaine, essor encouragé par les applications chaque jour plus nombreuses des agents superficiellement actifs.

Nous connaissons aujourd'hui plusieurs dizaines de milliers de composés différents (*). On les classe parfois, selon le but auquel on les destine, en agents mouillants, détergents, émulsifiants, etc., mais le plus souvent une même substance peut être utilisée pour différents emplois. Aussi, préfère-t-on les grouper en tenant compte de leur constitution chimique. On en distingue deux grandes classes selon l'aptitude des agents superficiellement actifs à donner ou non des ions en solution aqueuse. Les agents ionisés sont les plus nombreux; ils diffèrent les uns des autres par la charge de l'ion amphipathique. A côté des agents à anion actif (qui comprennent les savons ordinaires), on connaît des dérivés à cation actif (savons « invertis » ou « saponiums » [107]) et, enfin, des composés amphotères encore peu employés en pratique. Les agents non ionisés représentent les derniers nés apportés par la synthèse chimique à l'industrie des détergents.

Les recherches concernant les savons et, plus récemment, les nouvelles substances actives de synthèse ont toujours attiré l'attention des biologistes. C'est qu'en effet de nombreux principes immédiats biologiques présentent des propriétés très voisines : les saponosides, dans le règne végétal et, chez les animaux, les acides biliaires constituent des exemples très démonstratifs. Remarquons, en outre, avec Valko [215], la similitude de constitution chimique entre l'acide taurocholique et l'un des premiers détergents synthétiques ayant eu des applications industrielles intéressantes, la N-oléyl-N-méthyltaurine.

$C_{17}H_{33}CON\,(CH_3)\,CH_2CH_2SO_3^-$ — *N-oléyl-N-méthyltaurine.*

$C_{23}H_{39}O_3CONH\,CH_2CH_2SO_3^-$ — *Acide taurocholique.*

En dehors de ces deux exemples, un grand nombre de composés biologiques d'importance primordiale, s'ils ne sont pas doués de propriétés aussi spectaculaires, n'en possèdent pas moins une structure amphipathique indiscutable : acides gras, mono- et diglycérides, protéines même, possèdent tous

(*) Pour la liste des principaux agents actifs, consulter [187, 189].

au sein d'une même molécule, des groupements hydrophiles et des groupements hydrophobes. Ceci explique l'aptitude particulière de ces substances à donner des films monomoléculaires et à s'orienter d'une manière élective aux interfaces (Devaux, Langmuir). Or, la cellule est un milieu essentiellement polyphasique et l'on peut dire avec Rideal [177] que « nous devrions considérer l'état de la matière aux surfaces de séparation comme représentatif des conditions dans lesquelles s'opèrent l'équilibre et la cinétique chimiques dans les systèmes biologiques organisés ». On connaît par ailleurs de nombreux exemples de relation directe entre l'activité pharmacologique ou bactéricide d'une série de substances homologues et leurs propriétés tensio-actives [213].

Les propriétés biologiques des substances superficiellement actives ionisées ont fait l'objet, au cours de ces dernières années, d'un nombre considérable de travaux. Les composés anioniques [7], comme les composés cationiques [167], agissent non seulement sur les lipides, mais surtout sur les protéines [174] ou sur les cénapses lipidoprotéidiques [201]. Ils sont doués, pour la plupart, d'une toxicité importante, d'où leur utilisation fréquente comme antiseptiques [56, 73].

Les recherches expérimentales sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des substances superficiellement actives non ionisées, ont, jusqu'ici du moins, présenté beaucoup moins d'ampleur.

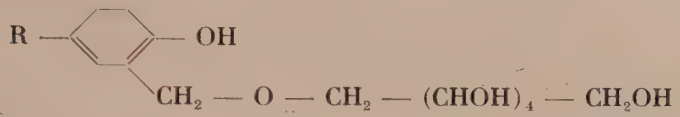
***

LES SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES NON IONISÉES

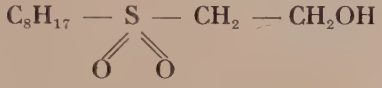
Il convient, dans le groupe de composés non ionisés, de faire une place particulière à des produits naturels d'origine végétale, les saponines ou, pour être plus conforme à la nomenclature moderne, les saponosides : il s'agit, en effet, d'hétérosides dont l'aglycone est de nature terpénique ou phénanthrénique [181]. Le groupement hydrophile est représenté ici par les nombreux groupements oxhydriles alcooliques de la partie glucidique. Utilisés depuis la plus haute antiquité comme agents de nettoyage, les saponosides se sont en outre

révélés des substances possédant des propriétés biologiques intéressantes [217, 202, 208].

Les différents agents actifs non ionogènes réalisés par synthèse se différencient par la nature du groupement chimique à caractère hydrophile. Ce dernier peut être un résidu glucidique, comme dans les saponosides; la condensation d'amyl- ou d'hexylphénol avec le glucose ou le sorbitol fournit des substances du type suivant :

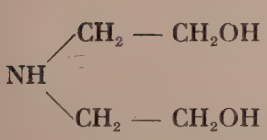


qui sont entièrement hydrosolubles à la condition que le groupement hydrophobe utilisé ait un poids moléculaire assez faible. L'utilisation du groupement sulfone comme groupement solubilisant, comme dans la *tert*-octyl-β-hydroxyéthylsulfone

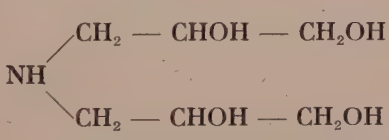


n'a pas dépassé les réalisations de laboratoire.

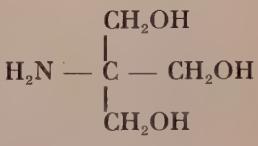
Plus importants sont les composés du type Ninol, obtenus par chauffage d'acide gras avec la diéthanolamine (I), la bis (dihydroxypropyl)-amine ou diglycérylamine (II) ou encore le triméthylolaminométhane (III).



I



II



III

L'hydrophilie des composés obtenus provient non seulement de l'introduction des — OH alcooliques, mais encore de la création de la fonction amide.

Les plus connus des agents superficiellement actifs non ionisés et ceux d'entre eux qui donnent lieu au plus grand nombre d'applications industrielles possèdent, comme groupement hydrophile, une chaîne polyoxyéthylénique provenant de la condensation de l'oxyde d'éthylène.

Il y a plus d'un siècle déjà que WURTZ a montré que l'oxyde d'éthylène peut se polymériser en donnant lieu à la formation de composés linéaires pouvant renfermer jusqu'à trente molécules d'époxyéthane. Une réaction du même type se produit par action de l'oxyde d'éthylène sous pression sur un alcool : on obtient tout d'abord

$$R-OH + \underset{\diagdown O \diagup}{CH_2-CH_2} \rightarrow R-O-CH_2-CH_2-OH$$

IV

un premier composé (IV) qui, possédant lui-même une fonction alcool, est susceptible de réagir à son tour avec l'oxyde d'éthylène, selon l'équation :

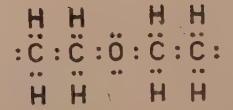
$$R-O-CH_2-CH_2-OH + \underset{\diagdown O \diagup}{CH_2-CH_2} \rightarrow$$

$$R-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$$

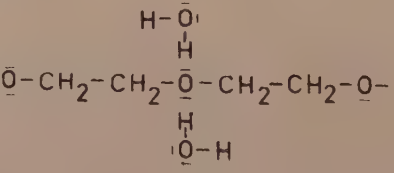
On obtient ainsi, en définitive, des dérivés polyoxyéthyléniques de l'alcool initial, du type :

$$R-\left[O-CH_2-CH_2-\right]_n-OH$$

L'oxygène du groupement oxyéthylénique possède deux doublets électroniques non partagés et encore éventuellement disponibles :



En présence d'eau, cet atome va s'entourer de deux molécules du solvant, retenues par des liaisons hydrogènes, comme nous l'avons figuré sur le schéma suivant où les doublets sont représentés par un trait tangentiel au symbole de l'atome, selon EISTERT [63].



Les molécules d'eau directement adsorbées en retiennent d'autres à leur tour; le groupement polyoxyéthylénique s'entoure ainsi d'une atmosphère aqueuse (lyosphère) qui lui confère un caractère fortement hydrophile. Aussi, les composés polyoxyéthyléniques et tout particulièrement les polyoxyéthylèneglycols répondant à la formule suivante :

$$HOH_2C-\left[CH_2-O-CH_2\right]_n-CH_2OH$$

sont-ils très solubles dans l'eau, même lorsque leur poids moléculaire est élevé.

Reprenons maintenant l'exemple précédent : partons d'un alcool à résidu R nettement hydrophobe (alcool à chaîne grasse ou alcool de la série cyclique). La présence dans la molécule de l'oxhydrile alcoolique hydrophile est insuffisante à rendre l'alcool soluble dans l'eau. Le traitement de l'alcool par l'oxyde d'éthylène va introduire dans la molécule un nombre croissant de groupements hydrophiles, le groupement hydrophobe demeurant inchangé. Lorsque la chaîne polyoxyéthylénique s'allonge, le rapport entre les parties lyophile et lyophobe de la molécule, autrement dit sa « balance hydrophile-lipophile » [216], prend bientôt une valeur compatible avec la dispersion complète du composé dans l'eau. On obtient ainsi un composé totalement hydrosoluble dont la structure amphipathique lui confère des propriétés de surface importantes.

L'oxyde d'éthylène est capable de réagir d'une manière analogue avec les phénols, les acides carboxyliques, les mercaptans, les amides, les amines et en général tous les composés organiques possédant un hydrogène réactif. Les acides gras fournissent ainsi des composés du type

$$R-CO-O-\left[CH_2-CH_2-O-\right]_n-H$$

que l'on peut également obtenir par estérification des polyéthylèneglycols (voir plus haut).

Les propriétés si générales de combinaison et de polymérisation de l'époxyde d'éthane ont été, depuis le travail initial de Schöller [184], appliquées à la synthèse d'un très grand nombre de substances superficiellement actives différant les unes des autres à la fois par la nature du produit insoluble de base (alcool, phénol, etc.) et par la longueur de la chaîne polyoxyéthylénique. On trouvera dans le tableau I la liste et la

TABLEAU I

NOM ET CONSTITUTION DES PRINCIPAUX AGENTS SUPERFICIELLEMENT ACTIFS NON IONISÉS A GROUPEMENT HYDROPHILE POLYOXYÉTHYLÉNIQUE.

NOM COMMERCIAL	FABRICANT	PRODUIT DE BASE	NOMBRE DE MOLÉCULES D'OXYDE D'ÉTHYLÈNE
Brij 30 et 35	Atlas Powder C° (U. S.)	Alcool laurique	?
Léonil O	I. G. Farben (All.)	Alcool oléylique	20
Emulphor O	I. G. Farben (All.)	Alcool oléylique	20
Cire de Sipol n° 2	Sinnova (Fr.)	Alcool cétylique	?
Despephor	Ets Despé (Belg.)	Alcool cétylique	?
Emulphor OL	I. G. Farben (All.)	Abiétinol	40
Emulphor A	I. G. Farben (All.)	Acide oléique	6
Emulsov A	Sovilo	Acide oléique	?
Myrj	Atlas Powder C° (U. S.)	Acide stéarique	?
Crilex 20 à 23	Croder Ltd (G. B.)	Acide stéarique	?
Crilex 17 et 19	Croder Ltd (G. B.)	Monostéarate de propylène-glycol	?
Atlox	Atlas Powder C° (U. S.)	Laurate de sorbitol	?
G. 2800	Atlas Powder C° (U. S.)	Dioléate de mannitol	?
Soromine AF	I. G. Farben (All.)	Oxyéthylamide stéarique	2
Triton NE	Rohm et Haas (U. S.)	Alkylphénol	3
Igepal F	I. G. Farben (All.)	*Iso*octylphénol	9
Emulphor A extra	I. G. Farben (All.)	Di-(*iso*hexyl*iso*heptyl)phénol	6,5
Emulphor MW	I. G. Farben (All.)	Di-(*iso*hexyl*iso*heptyl)phénol	7,5 - 8
Igepal W extra	I. G. Farben (All.)	*Iso*dodécylphénol	6
Igepal C extra	I. G. Farben (All.)	Dodécylphénol	12
Dismulgan III	I. G. Farben (All.)	Dodécylphénol	30
Emulphor ELN	I. G. Farben (All.)	Di-(*iso*heptyl)phénol	20
Lupon	I. G. Farben (All.)	Hexylheptyl-β-napthol	8
Léonil FFO	I. G. Farben (All.)	Hexylheptylnaphtol	9
Peregal ON	I. G. Farben (All.)	Hexylheptylnaphtol	9

composition des principaux composés utilisés dans l'industrie (*). Nous n'y avons pas fait figurer les produits réalisés à partir de produits non purifiés (dérivés polyoxyéthyléniques d'huile de palme, de mélanges d'acides gras naturels, etc.).

Les substances dont nous nous sommes servi pour notre travail sont des éthers polyoxyéthyléniques d'esters gras d'anhydride de sorbitol connus sous leur abréviation commerciale de « tweens ». Leur structure, que nous examinerons en détail dans les pages suivantes, apparaîtra légèrement plus complexe que celle des composés précédemment signalés. Les « tweens » présentaient cependant pour nous de nombreux avantages :

— Il en existe une gamme importante de représentants, de balance hydrophile-lipophile variée, différant par leur chaîne grasse et par l'importance de leurs groupements oxyéthyléniques;

— Les travaux de Dubos [57] et les études poursuivies par Krantz [102] ont montré l'intérêt biologique de ces substances;

— Grâce, enfin, à la Société des Produits pour l'Industrie et l'Agriculture (**), que nous tenons à remercier ici, nous avons toujours pu nous procurer ces substances, fabriquées aux Etats-Unis par la firme Atlas Powder C°, Wilmington, Delaware.

(*) Brevets allemands :
548.201; 605.973; 623.482; 626.491; 664.818; 667.744; 670.419; 680.245.

Brevets français :
713.426; 717.427; 427.202; 748.091; 751.293; 752.831; 768.732; 770.804; 780.144; 785.000; 789.522; 794.830; 815.911; 823.454; 823.486; 826.489; 838.863; 879.689.

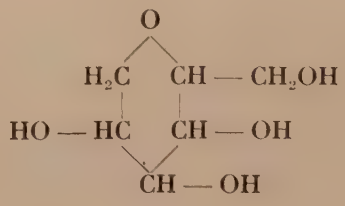
Brevets anglais :
346.550; 367.420; 380.431; 409.336; 415.718; 420.066; 420.518; 432.356; 434.424; 443.559; 443.631.

Brevets des Etats-Unis :
1.970.578; 2.048.512; 2.172.747; 2.174.760; 2.174.761; 2.213.417; 2.213.477; 2.214.352; 2.275.494; 2.310.679; 2.345.121; 2.371.133.

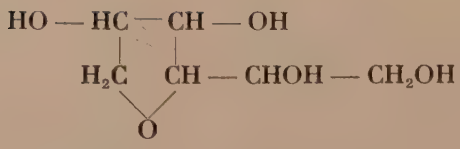
(**) 11, rue de Provence, Paris (IX^{e}).

LES DÉRIVÉS POLYOXYÉTHYLÉNIQUES D'ESTERS GRAS D'ANHYDRIDE DE SORBITOL

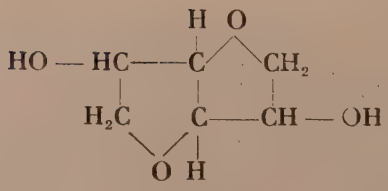
Le produit de base utilisé pour la fabrication des tweens (*) est le glucose qui, dans un premier temps, est hydrogéné en sorbitol. Le sorbitol est à son tour déshydraté pour fournir un mélange d'anhydrides en 2-6 (I) ou en 3-6 (II). Au cours de la réaction, il se forme également, en petite quantité, un anhydride double en 1-4, 3-6 (III).



I



II



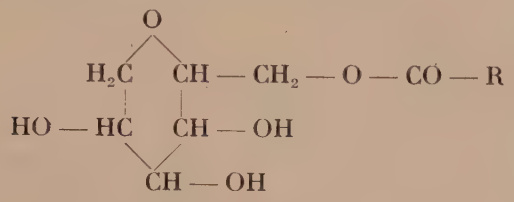
III

(*) Brevets allemands : 544.921 et 628.715.

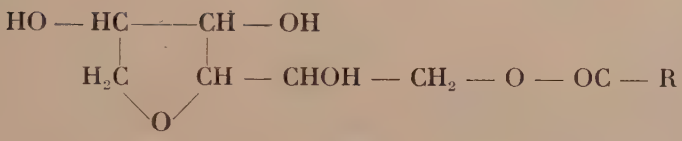
Brevets des Etats-Unis :

1.959.930;
2.322.810 - 1 (Brown; Atlas Powder C°);
2.380.166 (Griffin; Atlas Powder C°).

Les anhydrosorbitols sont ensuite traités par un acide gras en présence de 0,05 p. 100 de soude comme catalyseur, à une température d'environ 240° C pendant plusieurs heures, sous atmosphère inerte. On obtient ainsi l'ester correspondant ou « span », ce dernier mot étant suivi d'un chiffre précisant la nature et le nombre de molécules d'acides gras entrant dans sa constitution. Les monoesters laurique, palmitique, stéarique et oléique (respectivement spans 20, 40, 60 et 80) répondent donc principalement aux formules IV et V :



IV



V

On réalise aussi la synthèse du triester oléique (span 85). Tous ces composés se présentent sous la forme de produits huileux (spans 20, 80, 85) ou cireux (spans 40 et 60) solubles dans les huiles et nombre de solvants organiques, mais insolubles dans l'eau ou en tout cas faiblement dispersibles. Leur structure amphipathique en fait d'excellents agents émulsionnants pour les systèmes « eau dans l'huile ».

Les tweens sont les éthers polyoxyéthyléniques des spans; ils renferment de 10 à 30 molécules d'oxyde d'éthylène par molécule d'ester, le tween étant bien entendu d'autant plus hydrophile que le nombre de chaînons $CH_2 — CH_2 — O$ introduit est plus élevé. L'oxyéthylation s'effectue en autoclave, à 110° C en présence de méthylate de sodium agissant comme catalyseur. La marche de la réaction doit être minutieusement suivie, car la polymérisation est fortement exothermique et, en l'absence de refroidissement convenable, risque d'être explosive. La réaction est terminée lorsque tout l'oxyde d'éthylène

est employé, ce dont témoigne le retour à la pression atmosphérique. Le produit obtenu est finalement traité sous vide à 150° par la vapeur d'eau et purifié par addition de charbon actif.

On a adopté pour les tweens des désignations abrégées calquées sur celles des spans : à l'ester laurique d'anhydride de sorbitol par exemple (span 20), correspond le « tween 20 », éther polyoxyéthylénique du précédent. Nous utiliserons dans la suite de notre exposé ces appellations arbitraires mais consacrées par l'usage.

Les tweens, comme d'ailleurs la totalité des substances superficiellement actives utilisées dans l'industrie et la presque totalité des préparations de laboratoire, ne sont pas des substances pures. En plus des différentes modalités d'anhydrisation du sorbitol déjà signalées, les acides gras utilisés pour l'estérification dérivent de corps gras naturels et mêmes purifiés, renferment toujours un faible pourcentage de composés possédant une chaîne de longueur voisine. Si l'estérification s'effectue presque intégralement sur la fonction alcool primaire de l'anhydride de sorbitol, si le dernier stade de la préparation introduit bien un nombre constant de chaînons oxyéthyléniques, la répartition de ces derniers groupements sur les oxhydriles libres s'effectue d'une manière statistique.

Les tweens correspondent donc à un mélange de substances en réalité très voisines les unes des autres. En effet, les nombreux contrôles effectués au cours de la fabrication (mesure des points de fusion, de l'indice d'hydroxyle, de l'indice de saponification) font que les préparations sont très homogènes. Nous avons constaté nous-même, au cours de notre expérimentation, que nos résultats étaient parfaitement superposables avec des échantillons provenant de lots de fabrication différents.

Nous avons résumé dans les tableaux suivants (tableaux II et III) les principales propriétés physiques des différents agents non ionisés que nous avons employés au cours de notre travail. On y trouvera également leur désignation abréviative usuelle.

TABLEAU II

TENSIONS SUPERFICIELLE ET INTERFACIALE, EN DYNES/CM, DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES DÉRIVANT DE L'ANHYDRIDE DE SORBITOL, DISSOUTES OU DISPERSÉES DANS L'EAU DISTILLÉE A 25° C. MESURE AVEC LE TENSIOMÈTRE DE LECOMTE DU NOÜY.

	TENSION SUPERFICIELLE					TENSION INTERFACIALE (*)				
	Concentration en g p. 100 cm³					Concentration en g p. 100 cm³				
	0,001	0,01	0,1	1,0	5,0	0,001	0,01	0,1	1,0	5,0
Span 20..	48	32	30	28	27	> 25	7,5	5,0	3,5	2,7
Span 80..	45	33	31	30	29	> 25	3,0	2,8	2,5	2,5
Span 85..	47	40	35	32	.....	> 25	17,0	4,0	3,0	.....
Tween 20.	50	39	37	36	35	> 20	9,0	7,5	6,0	5,5
Tween 21.	49	37	33	32	31	> 20	12,2	5,4	4,4	3,4
Tween 40.	50	43	41	40	39	> 20	13,0	10,5	9,0	8,0
Tween 60.	51	46	44	43	42	17	14,0	11,5	10,0	9,0
Tween 80.	53	45	42	41	40	21	12,5	11,0	10,0	8,5
Tween 81.	55	44	40	38	37	> 20	16,0	11,0	8,5	7,0
Tween 85.	41	44	43	42	41	11,5	11,0	10,5	10,0	9,5
Brij 35...	51	42	42	42	42	20,3	11,5	11,2	10,8	10,6
G 2153...	55	47	46	46	45	.....	15,9	14,2	13,2	12,4

(*) Mesurée à l'interface solution aqueuse/huile de paraffine (Nujol).

TABLEAU III

Composition et solubilité des substances superficiellement actives dérivant de l'anhydride de sorbitol

Composition	Nom usuel	Etat a 25° C	Solubilité													
			Eau	Toluène	Ether de pétrole	Huile minérale	Acétone	Ether	Dioxane	Cellosolve (*)	Tétrachlorure de carbone	Méthanol	Ethanol	Acétate d'éthyle	Ethylèneglycol	Aniline
Monolaurate d'ANHS (**)	Span 20	Liquide huileux	D	S*	SL	SC	SC	SL	SL	S	SL	S	S	SC	SC	SC
Monooléate d'ANHS	Span 80	Liquide huileux	D	S*	S*	SL	I	PS	S*	S	S*	S*	S*	SL	I	S*
Trioléate d'ANHS	Span 85	Liquide huileux	D	S	S	S	SC	S*	S*	S	S	SC	SC	S	I	S*
DPOE (***) du monolaurate d'ANHS	Tween 20	Liquide huileux	S	S*	I	I	SL	SC	S	S	S	S	S	S	S*	S
DPOE du monolaurate d'ANHS	Tween 21	Liquide huileux	SCG	SL	SL	SC	S*	SC	S	S	S	S	S	SC	SC	S
DPOE du monopalmitate d'ANHS ...	Tween 40	Liquide huileux (****)	S	S*	S*	I	S	SC	S	S	S*	S	S	S	S	S
DPOE du monostéarate d'ANHS	Tween 60	Liquide huileux (****)	S	S	S*	I	S*	I	S*	S*	S*	S*	S*	S	I	S
DPOE du monooléate d'ANHS.....	Tween 80	Liquide huileux	S	S	I	I	PS	S*	S*	S	S*	S	S	S	SC	S
DPOE du monooléate d'ANHS.....	Tween 81	Liquide huileux	D	S*	SC	S	SC	D	S	S	S*	S	S	S	D	S
DPOE du trioléate d'ANHS	Tween 85	Liquide huileux	D	S*	SC	SL	SC	S*	S*	S	S*	S	S	S	SC	S*
DPOE d'alcool laurique	Brij 35	Solide cireux	S	PS	I	I	S	S	S	S	S*	S	S	S	I	S
DPOE d'acide stéarique	G 2153	Solide cireux	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S = Soluble;
* = Insoluble à certaines concentrations;
SC = Soluble à forte concentration;
PS = Peu soluble;
L = Solution louche;
D = Dispersible;

(*) Ether diéthylique de l'éthylèneglycol;
(**) ANHS = Anhydrosorbitol;
(***) DPOE = Dérivé polyoxyéthylénique;
(****) A 50° C seulement; à température ordinaire, se gélifie partiellement.

Pour exposer nos résultats expérimentaux, nous avons adopté le plan suivant :

PREMIÈRE PARTIE

Recherches expérimentales sur les propriétés physicochimiques des tweens.

CHAPITRE PREMIER. — LA STABILITÉ DES TWEENS ET DE LEURS SOLUTIONS.

I. — Dissolution des tweens dans l'eau. Influence de la température.

II. — Influence de la concentration saline sur les solutions.

III. — Conservation des solutions aqueuses de tweens.

IV. — Action des ultrasons sur le tween 20.

CHAPITRE II. — LES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES OBTENUES AVEC LES TWEENS.

I. — Phénomènes de solubilisation.

A. — Solubilisation en milieu aqueux.

B. — Solubilisation en milieu hydroalcoolique.

C. — Conclusions. Le pouvoir solubilisant des tweens.

II. — Formation de figures myéliniques.

III. — Associations moléculaires avec des détergents ionisés.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales sur les propriétés biologiques des tweens.

CHAPITRE PREMIER. — TOXICITÉ DES TWEENS.

I. — Toxicité pour la Daphnie.

II. — Toxicité pour l'embryon de Poulet.

III. — Pouvoir hémolytique des tweens.

IV. — Action sur la perméabilité capillaire.

V. — Discrimination gustative des différents tweens par le Rat blanc.

VI. — Action sur la germination des graines.

Chapitre II. — Etude biologique des associations moléculaires.

I. — Coloration vitale des lipides du tissu adipeux par le noir Soudan.

II. — Toxicité des associations moléculaires avec les substances superficiellement actives ionisées.

III. — Extraction du cholestérol sérique.

Chapitre III. — Etude particulière de certains tweens.

I. — Tween 80 et tuberculose expérimentale du Cobaye.

II. — Etude du dérivé iodé du tween 80.

Conclusions générales.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DES TWEENS.

CHAPITRE PREMIER

LA STABILITÉ DES TWEENS ET DE LEURS SOLUTIONS

Les propriétés solubilisantes importantes des tweens, jointes à leur faible toxicité, les rendent particulièrement aptes à la réalisation de diverses solutions utilisables en thérapeutique ou pour l'expérimentation pharmacodynamique de substances non hydrosolubles. De telles préparations, rendues isotoniques grâce à l'adjonction d'électrolytes qui assurent en outre leur équilibre ionique, doivent être stables et, autant que possible, se conserver sans altération un temps suffisant. C'est pour répondre à ces données que nous avons effectué un certain nombre d'essais concernant la stabilité des tweens et celle de leurs solutions.

I. — DISSOLUTION DES TWEENS DANS L'EAU. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Les tweens 20, 40, 60 et 80 se dissolvent parfaitement dans l'eau distillée pour donner des solutions claires et transparentes, présentant toutefois pour les fortes concentrations, un très léger effet Tyndall. Ces solutions sont neutres (pH = 6,8 à 7).

La réalisation d'une solution aqueuse de tween 20, à la concentration de 10 p. 100, par exemple, s'effectue en quelques minutes à la température du laboratoire. Pour les trois autres produits, la solubilisation se montre beaucoup plus lente dans

ces conditions; on ne peut même obtenir, pour une température inférieure à 20° C de solution limpide avec le tween 60, homologue stéarique, correspondant donc à l'acide gras à chaîne la plus longue. Il est donc préférable d'opérer avec de l'eau à la température d'environ 45-50° C. La dissolution est alors très rapide, les solutions très claires *le demeurent même après refroidissement à + 1° C.*

Ces particularités de la dissolution des tweens nous semblent pouvoir s'interpréter assez simplement. Dans la masse cireuse ou liquide du tween, les molécules ne présentent aucune orientation particulière les unes par rapport aux autres. En présence d'eau, les chaînons oxyéthyléniques situés en position superficielle s'hydratent, tendant à entraîner en phase aqueuse le restant de la molécule et en particulier les restes d'acides gras hydrophobes retenus dans la masse par une cohésion d'autant plus forte que les chaînes paraffiniques sont plus longues et se trouvent sous un état physique solide. Nous observons ici un nouvel exemple du conflit affinité pour l'eau-cohésion (Dervichian [47, 53]). L'affinité pour l'eau l'emporte pour le tween 20, dont la chaîne hydrophobe ne possède que douze carbones : aussi, la dissolution de l'ester laurique est-elle rapide; elle est plus lente pour les tweens 40 (chaîne en C_{16}) et 80 (chaîne en C_{18}), dont la cohésion est plus forte; elle est incomplète pour le tween 60. Si l'on chauffe maintenant ce dernier composé à 50° C en présence d'eau, le changement d'état physique de la chaîne stéarique entraîne une forte diminution de la cohésion permettant la solubilisation de la molécule et, pour une concentration convenable, la formation de micelles. Au cours du refroidissement, la solution de tween 60 reste claire et transparente, les molécules s'étant préalablement orientées de manière à amener la totalité de leurs groupements hydrophiles en phase aqueuse. Le bon comportement des tweens aux basses températures explique l'emploi de ces composés comme fluide hydraulique dans l'industrie du froid (Osborn [159]).

Le comportement des solutions aqueuses des tweens 40, 60 et 80, pour les températures supérieures à 50° C, est également intéressant à examiner. Vers 55 à 60° C, on constate que la solution, jusqu'alors parfaitement limpide, devient de plus en plus opalescente au fur et à mesure que la température s'élève. Vers 80° C, la solution louche et opaque se sépare bientôt en deux couches liquides. La couche inférieure, jaune et huileuse, possède l'aspect du tween; elle est surmontée d'une couche

incolore aqueuse. Cette couche se redissout lorsque la température baisse : le phénomène est parfaitement réversible et peut être reproduit un grand nombre de fois. Une telle insolubilisation se produit également avec toutes les substances à activité superficielle non ionisées possédant un groupement hydrophile polyoxyéthylénique. Cette propriété donne lieu dans l'industrie textile à d'intéressantes applications pour le nettoyage des fibres. On dépose les fibres sales dans des solutions de l'agent actif qu'on porte à ébullition. La solution se trouble puis se déphase, et l'on peut, pour un degré d'oxyéthylation approprié, porter sur la fibre tout l'agent de lavage se trouvant dans le bain; il en résulte un véritable déplacement des souillures et graisses qui se trouvent ainsi, sans aucune agitation du milieu, émulsionnées dans la phase huileuse. Lors du rinçage qui s'effectue à une température moins élevée, l'éther polyglycolique se dissout à nouveau, entraînant avec lui les impuretés qui avaient été détachées du tissu [180, 189].

Le déphasage des solutions de tween à haute température provient de la rupture au moins partielle des liaisons hydrogène maintenant l'hydratation des atomes d'oxygène des groupements oxyéthyléniques. On sait que ce type de liaison est particulièrement sensible à la chaleur.

Tandis que nous avons vu précédemment le tween 60 ne pouvoir se dissoudre directement à froid à cause de la trop grande cohésion amenée par sa partie hydrophobe, nous le voyons s'insolubiliser à chaud pour un motif différent : la diminution d'affinité pour l'eau de son pôle hydrophile.

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SALINE SUR LES SOLUTIONS

L'introduction de sels minéraux dans les solutions de tweens dans l'eau distillée ne s'accompagne d'aucune modification visible de leur limpidité tant que la concentration ionique reste faible : on peut ainsi réaliser des solutions isotoniques de ces agents actifs correspondant à l'eau physiologique ordinaire ou au liquide de Ringer. Le caractère non ionique des tweens, et tout particulièrement l'absence de groupement carboxylique dans leur molécule, permet l'introduction d'ions Ca^{++} ou Mg^{++} absolument incompatibles avec les savons ordinaires,

L'addition aux solutions aqueuses de plus grandes quantités de sels produit, à la température du laboratoire, un relargage de l'agent actif qui s'insolubilise sous forme de coacervat liquide pour les tweens fluides (tweens 20 et 80) ou sous forme d'un précipité (tweens 40 et 60). Avec ces derniers composés, on obtient également la séparation d'une phase liquide si la température est plus élevée (50° C par exemple). Le tableau IV indique quelques valeurs numériques dans le cas particuliers du sulfate d'ammonium. On remarquera que l'insolubilisation du tween se réalise pour une concentration saline inférieure lorsque la solution est plus riche en agent actif.

TABLEAU IV

QUANTITÉS DE SOLUTION SATURÉE EN SULFATE D'AMMONIUM (EN cm^3), NÉCESSAIRES POUR PRODUIRE LE DÉBUT DU RELARGAGE DE 10 cm^3 DE SOLUTION DE TWEEN DANS L'EAU PHYSIOLOGIQUE. (EXPÉRIENCE RÉALISÉE A LA TEMPÉRATURE DE 17°5 C.)

CONCENTRATION DE L'AGENT ACTIF	TWEEN 20	TWEEN 40	TWEEN 60	TWEEN 80
10 g p. 100	3,3	1,5	1,0	1,6
5 g p. 100	3,8	2,0	1,4	2,2
2,5 g p. 100	4,0	2,7	2,0	2,8

Nous avons étudié, avec R. JENSEN, les particularités du relargage par les sels neutres non seulement des tweens, mais encore de différents composés à chaîne polyoxyéthylénique, les polyéthylèneglycols en particulier. Comme ces recherches, non encore terminées, doivent faire par ailleurs l'objet de publications [154, 90], nous nous contenterons d'en résumer les premiers résultats.

La concentration saline nécessaire pour produire le début du relargage est fortement influencée par la température et diminue quand la température s'élève. Elle dépend d'autre part de la nature même du sel. On peut donc étudier le pouvoir coacervatif (ou précipitant) des différents sels en mesurant, pour différentes valeurs de concentration saline, la température minima entraînant le déphasage. Pour un même cation,

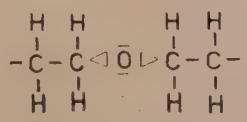
le sulfate se montre plus actif que le chlorure, ce dernier amenant, à concentration égale, la coacervation à une température supérieure; le chlorure à son tour possède un pouvoir de relargage supérieur à celui du nitrate. La séquence :

$$NO_3^- < Cl^- < SO_4^{--}$$

est celle que l'on retrouve dans la série de HOFMEISTER. On serait donc tenté d'assigner au déphasage du tween de sa solution aqueuse le mécanisme suivant : dans le groupement oxyéthylénique, la liaison de covalence entre le carbone et l'oxygène, atome d'affinité électronique plus grande, est partiellement polarisée et développe des charges électriques, inférieures à la charge d'un ion, habituellement représentées par δ^+ et δ^- (inequality of sharing, selon LEWIS) :

$$\begin{array}{ccccc} & \delta^+ & \delta^- & & \\ — & C & — O & — & C — \\ & & \delta^- & & \delta^+ \end{array}$$

On peut également adopter le schéma suivant où les coins



à pointe tournée vers les atomes à octet relâché remplacent les traits de liaison. L'apparition de ces faibles charges électriques sur l'oxygène favorise la fixation sur cet atome de molécules d'eau grâce à la formation de liaisons hydrogène (voir p. 10).

Lorsqu'on introduit un sel neutre dans la solution aqueuse du composé polyoxyéthylénique, ce sel s'ionise et le cation aura tendance à neutraliser la faible charge, de signe opposé, portée par l'atome d'oxygène du groupement

$$— CH_2 — CH_2 — O — CH_2 — CH_2 —,$$

entraînant ainsi le départ des molécules d'eau retenues à ce niveau et l'insolubilisation du composé.

L'efficacité du cation dépend de la nature de l'anion avec lequel il est associé. Lorsque le rayon ionique de cet anion est faible, ou, ce qui est équivalent, lorsque l'anion est peu hydraté, cet ion subit une forte répulsion de la part de l'atome d'oxygène du chaînon oxyéthylénique, tandis qu'il a tendance à immobiliser dans son champ les cations ; les cations ne

peuvent plus, dans ces conditions, effectuer la neutralisation des charges négatives de la chaîne polyoxyéthylénique. Au contraire, les anions entourés d'une importante couronne de molécules d'eau, qui maintient à distance les particules ionisées, seront peu influencés par la charge de la liaison covalente polarisée et laisseront aux cations une plus grande liberté d'action. L'activité particulière de l'anion sulfate se montre donc en rapport avec la forte hydratation de cet ion.

Si ce mécanisme est exact, le pouvoir coacervatif des cations devrait être proportionnel à leur charge et, pour des ions de même charge, varier en sens inverse du rayon ionique; nous devrions donc retrouver également pour les cations, en conservant le même anion, la séquence de Hofmeister. Il n'en est rien et l'on observe, pour les différents sulfates par exemple, les valeurs suivantes du pouvoir de relargage :

$$Cu^{++} < Cd^{++} < Li^{+} < NH_4^{+} < Zn^{++} < Co^{++} < Ni^{++} < Mn^{++} < Mg^{++} < Na^{+}$$

L'efficacité de ces différents cations se montre sensiblement la même vis-à-vis des quatre tweens 20, 40, 60 et 80, mais cet ordre diffère sensiblement de celui déterminé pour la coacervation des polyoxyéthylèneglycols [90] ; de plus, la séquence précédente subit de légères modifications selon la concentration saline à laquelle on opère et surtout selon l'anion associé au cation.

Le déphasage amené par les sels neutres dans les solutions aqueuses de tweens apparaît donc comme un phénomène particulièrement complexe. Retenons surtout l'action favorisante de la température, en rapport avec la faible stabilité vis-à-vis de l'agitation thermique des liaisons hydrogène qui assurent l'hydratation des atomes d'oxygène des groupements oxyéthyléniques et la dispersion aqueuse des tweens.

III. — CONSERVATION DES SOLUTIONS AQUEUSES DE TWEENS

Les tweens renferment toujours une faible proportion d'acide gras libre provenant du fait que l'estérification de l'anhydride de sorbitol n'est jamais absolument complète. Cette quantité d'acide gras libre peut être évaluée [8, 40] ; pour le tween 80, par exemple, produit de combinaison d'une molécule d'acide oléique, d'une molécule d'anhydride de sorbitol et de 20 molécules d'oxyde d'éthylène, l'acide gras libre ne

correspond qu'à 3 p. 100 de l'acide oléique total, soit à 0,6 p. 100 du poids du composé superficiellement actif. Cette minime fraction d'acide gras libre est solubilisée par l'agent actif; aussi les solutions aqueuses des différents tweens sont-elles absolument transparentes au moment de leur préparation.

Quand ces solutions sont préparées sans précautions spéciales d'asepsie, et quand on les conserve à la température ordinaire, on constate qu'elles sont bientôt le siège d'une pullulation microbienne : ces composés ne possèdent en effet aucun pouvoir antiseptique. Les solutions aqueuses, initialement parfaitement limpides, se troublent progressivement et, à la longue, laissent déposer sur les parois du récipient une quantité appréciable d'acide gras. Les tweens sont en effet, comme nous l'avons vu plus haut, des esters, donc des composés assez facilement hydrolysables, non seulement par voie chimique, mais encore par voie enzymatique : on a même proposé d'employer les tweens comme substrats pour l'étude des lipases [8].

La conservation des solutions de tweens à la glacière, à la température de + 2° C, en inhibant le développement des micro-organismes, favorise beaucoup la conservation des solutions. Elles ne deviennent louches qu'après plusieurs semaines et même souvent après plusieurs mois seulement.

Nous avons constaté qu'il était possible de soumettre les solutions des différents tweens à la tyndallisation, ou même à la stérilisation à l'autoclave à 120° C. Il se produit évidemment, sous l'influence de la chaleur, un déphasage de l'agent actif qui redonne cependant une solution transparente lorsque la température revient à des valeurs plus faibles. Il est d'ailleurs très probable que le déphasage qui sépare le tween de la phase aqueuse empêche de ce fait l'hydrolyse.

Nous avons étudié la conservation, à la température ambiante et à 37° C, de solutions de tweens stérilisées à l'autoclave et réalisées dans les milieux suivants :

Série 1 : eau distillée;
Série 2 : eau physiologique;
Séries 3 à 8 : eau physiologique 2 vol.;
tampon phosphatés (*) 1 vol.

(*) Tampons phosphatés iso-osmotiques de Hendry [85], mélange de solutions de PO_4NaH_2 0,15 M et de PO_4Na_2H 0,115 M.

Les valeurs du *p*H, mesurées à l'électrode de verre, sont les suivantes pour les diverses séries :

Séries 1 et 2 : 6,7 - 6,8, selon le tween;
Série 3 : 5,4;
Série 4 : 6,2;
Série 5 : 6,6;
Série 6 : 6,9;
Série 7 : 7,3;
Série 8 : 7,9.

Après trois jours, les solutions de tween 60 correspondant aux séries 6, 7 et 8 ont présenté un louche dont l'importance est allée ensuite en croissant. Nous avons observé un louche beaucoup plus faible et plus tardif (quinze jours) pour les séries 7 et 8 des tweens 20, 40 et 80. Les autres solutions sont demeurées claires pendant plus d'un an.

Les tweens en solution aqueuse se montrent donc assez résistants à l'hydrolyse, à condition que le *p*H du milieu soit légèrement acide; l'ester stéarique (tween 60) apparaît plus sensible.

Nous avons toujours tenu néanmoins, dans la suite de notre travail, à n'utiliser que des solutions de tweens fraîchement préparées.

IV. — ACTION DES ULTRASONS SUR LE TWEEN 20

De nombreux composés organiques subissent de profondes modifications chimiques sous l'action de l'irradiation ultrasonique : réactions de décomposition accompagnées d'un dégagement gazeux, favorisé par la « cavitation » du liquide, réactions d'oxydation ou, plus rarement, de réduction. Les macromolécules soumises aux ultrasons peuvent se cliver en particules plus petites [21, 22] ou se dépolymériser [200, 210, 183, 137, 173]. Le traitement d'une substance par les ultrasons permet donc d'apprécier sa stabilité.

C'est dans ce but que nous avons voulu étudier le comportement des tweens vis-à-vis des ondes ultrasoniques. Nous avons choisi pour notre expérience le tween 20 qui se présente à la température du laboratoire sous forme d'un liquide beaucoup plus facile à introduire dans l'éprouvette d'expérience que les masses pâteuses que constituent les homologues palmitique ou stéarique (tweens 40 et 60). De plus, le tween 20 possède une chaîne grasse saturée beaucoup moins sensible à l'oxydation que la chaîne éthénique du tween 80.

Nous avons utilisé comme émetteur d'ultrasons le puissant appareil construit au laboratoire de Physique Médicale par MM. Piffault, Blanquet et Quéré. Cet appareil ayant été décrit par ailleurs [165], nous rappellerons simplement qu'il s'agit d'un générateur qui délivre 1 kilowatt haute fréquence, soit environ 100 watts ultrasonores. Le quartz utilisé possède une fréquence fondamentale de 571 kilocycles.

Nous avons versé environ 150 g de tween 20 dans l'éprouvette de l'appareil; le fond de cette éprouvette est constitué par un diaphragme d'acétate de cellulose qui est directement appliqué sur le quartz. Une circulation d'eau assure le refroidissement de la préparation. La vibration du quartz provoque dans le tween l'apparition d'un geyser d'environ 4 cm de haut.

Nous avons réalisé une première expérience d'une durée de quarante minutes. Après trois, six, neuf, vingt et quarante minutes, on arrête l'irradiation pour prélever environ 5 g du tween contenu dans l'éprouvette. On réalise avec chacun des échantillons une solution à 10 p. 100 dans l'eau distillée et l'on mesure la tension superficielle de la solution ainsi réalisée avec l'appareil de Dognon-Abribat, et sa viscosité à l'aide du viscosimètre à bille de Hoeppler. Une rupture de la chaîne grasse ou une dépolymérisation de la partie polyoxyéthylénique du composé actif, en modifiant sa balance hydrophile-lipophile et ses dimensions moléculaires, devrait entraîner d'importantes modifications des valeurs de la tension superficielle et de la viscosité des solutions.

Nos résultats sont contenus dans le tableau V.

Nous constatons que l'irradiation du tween 20 n'a pas amené, dans nos conditions d'expérience, de modifications bien sensibles des propriétés de la solution.

Nous avons alors effectué une deuxième expérience en prolongeant l'irradiation pendant trois heures (prélèvements après une, deux et trois heures). Les mesures de tension superficielle sont effectuées sur des solutions à 10 p. 100 et à 0,5 p. 100. On mesure également le *p*H de la première solution pour déceler la libération éventuelle d'acides gras (tableau VI).

Cette deuxième expérience confirme les résultats de la première. Le tween 20 ne semble donc pas altéré par une irradiation puissante (100 watts) et prolongée (trois heures).

TABLEAU V

Irradiation ultrasonique du tween 20

Temps d'irradiation (en minutes)	Tension superficielle de la solution a 10 p. 100 (en dynes/cm). Mesure réalisée immédiatement après agitation de la surface.	Temps de chute de la bille du viscosimètre (en secondes). t = 14° C
0	36,5	167 4/10
3	36,5	166 6/10
6	37,0	166 8/10
9	36,5	167 6/10
20	37,0	169
40	37,0	167 4/10

TABLEAU VI

Irradiation ultrasonique du tween 20

Temps d'irradiation (en heures)	Tension superficielle (en dynes/cm) Mesure réalisée immédiatement après agitation de la surface.		Temps de chute de la bille (en secondes) du viscosimètre t = 21° C	*p*H de la solution à 10 p. 100
	Solution à 10 p. 100	Solution 0,5 p. 100		
0	37	38,75	156	6,63
1	37	39	156 2/10	6,60
2	37	39	156 2/10	6,61
3	37	39	156	6,64

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Les dérivés polyoxyéthyléniques des esters laurique, palmitique, stéarique et oléique de l'anhydride de sorbitol (tweens 20, 40, 60 et 80) sont solubles dans l'eau distillée et dans les solutions de faible concentration saline. Leur solubilité présente un coefficient thermique négatif : pour une température suffisante, les liaisons hydrogène responsables de l'hydratation de la chaîne polyoxyéthylénique se rompent et les agents actifs se séparent complètement de la phase aqueuse. Un déphasage analogue se produit sous l'action des sels neutres à forte concentration, également favorisé par l'élévation de la température.

En présence de micro-organismes, les solutions de tweens se dégradent assez rapidement. Elles supportent la stérilisation et ne subissent alors qu'une hydrolyse minime en milieu neutre ou faiblement acide : leur conservation prolongée est possible dans ces conditions.

Le tween 20 apparaît comme un composé très stable susceptible de résister à une irradiation ultrasonique puissante et prolongée.

CHAPITRE II

LES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES OBTENUES AVEC LES TWEENS

La formation de films monomoléculaires, l'existence de micelles en solution aqueuse, le pouvoir solubilisant, l'activité aphrogène ainsi que de nombreuses propriétés physico-chimiques si caractéristiques des agents superficiellement actifs s'expliquent par la structure amphipathique de ces substances et leur possibilité de formation spontanée et réversible d' « associations moléculaires ».

Dans ces associations moléculaires, les composés constitutifs n'ont, à priori, aucune raison de s'unir l'un à l'autre par des liaisons chimiques ordinaires; leurs rapports moléculaires ne sont d'ailleurs habituellement pas des nombres entiers. Les phénomènes d'association débordent le cadre de la chimie colloïdale : on connaît maintenant plusieurs exemples de ces combinaisons particulières dans le domaine de la cristallographie (*).

Nous étudierons tout d'abord les associations moléculaires fournies par les tweens avec des composés non hydrosolubles. Comme pour les agents superficiellement actifs ionisés, les propriétés de ces associations dépendent étroitement de la proportion relative des constituants soluble et insoluble [47, 53]. En présence de grandes quantités de tween, on observera la solubilisation du composé insoluble: lorsque la proportion d'agent actif sera moindre, nous n'aurons plus, en présence d'eau, que des formes de gonflement (figures myéliniques).

(*) Voir 172, 228.

Nous terminerons ce chapitre par l'étude des associations entièrement hydrosolubles que fournissent les tweens avec quelques substances superficiellement actives ionisées.

I. — PHÉNOMÈNES DE SOLUBILISATION

Qu'elles soient ou non ionisées, les substances superficiellement actives possèdent des molécules dont le caractère amphipathique explique l'analogie d'un grand nombre de propriétés physiques de ces deux classes de composés. Tout comme les électrolytes colloïdaux, les agents actifs non ionogènes donnent lieu à la formation de micelles en solution aqueuses; pour plusieurs d'entre eux, Gonick et Mc Bain [76] ont prouvé cette existence en montrant que le coefficient osmotique de Bjerrum (*) s'abaisse considérablement quand la concentration de la solution en agent actif augmente. Les solutions micellaires des agents actifs non ionisés sont donc capables de solubiliser des produits non hydrosolubles, en particulier des colorants [123, 122, 79].

Poursuivant des besoins expérimentaux variés, différents auteurs ont utilisé les propriétés solubilisantes des tweens [109, 28, 66, 199, 212, 26], mais le problème de la solubilisation par ce type de substances n'a jamais fait l'objet d'une étude systématique. Nous avons étudié deux modalités différentes du phénomène de solubilisation : la solubilisation en milieu aqueux et la solubilisation en milieu hydroalcoolique.

A. — Solubilisation en milieu aqueux

Dans cette première série d'expériences, nous avons étudié la solubilisation en phase aqueuse de diverses substances non hydrosolubles en opérant de la manière suivante : on réalise en premier lieu une solution, de titre variable, de la substance à solubiliser dans l'un des quatre tweens hydrosolubles, tween 20, 40, 60 ou 80; nous examinons ensuite le comportement de cette solution vis-à-vis de l'eau.

Solubilisation du cholestérol

Nos premiers essais ont été réalisés avec le cholestérol, et ceci pour plusieurs raisons. Sa constitution chimique, tout

(*) Rapport de l'abaissement du point de congélation constaté expérimentalement à l'abaissement théorique du point de congélation correspondant à la dispersion complète.

d'abord, le rapproche d'un grand nombre de composés d'intérêt biologique primordial, vitamines du groupe D, hormones sexuelles et corticosurrénales, principes immédiats dont il est le précurseur métabolique et qui sont tous, comme lui, insolubles dans l'eau. La dispersion aqueuse de ces substances sous forme de pseudosolutions aqueuses transparentes, offre à priori des perspectives séduisantes pour l'expérimentation physiologique et la thérapeutique humaine. Le cholestérol, substance peu onéreuse et facile à obtenir sous une forme très pure, se prête particulièrement bien aux essais expérimentaux. Ce stérol, enfin, est un constituant répandu dans tous les tissus où on le trouve souvent « solubilisé » : le sérum sanguin, par exemple, qui en contient 1,5 g par litre et souvent plus au cours d'états pathologiques, est un milieu parfaitement limpide. Il semble intéressant de lui comparer des « solutions » aqueuses transparentes de cholestérol, réalisées artificiellement.

Les différents tweens, chauffés au bain-marie à 100° C, dissolvent lentement les cristaux de cholestérol. Nous avons déterminé la solubilité du cholestérol à cette température en ajoutant à une masse connue de tween le stérol par fractions de 100 puis de 50 mg, en ayant soin de n'effectuer chaque addition qu'après dissolution complète des cristaux précédemment ajoutés, lorsque le milieu est redevenu bien limpide. La solubilité du cholestérol dans les tweens prend une valeur plus élevée quand la chaîne grasse de l'agent actif est plus longue. Voici les quantités maxima de cholestérol dissoutes à 100° C par les différents tweens (solutions saturées) :

Tween 20	: 9	g de cholestérol p. 100
Tween 40	: 12	— —
Tween 60	: 13,5	— —
Tween 80	: 13	— —

Pour une température inférieure, ces valeurs sont beaucoup plus faibles. Une solution saturée à 100° C se prend en masse dès qu'on la retire du bain-marie : le cholestérol en excès précipite sous forme de fins cristaux dont l'enchevêtrement solidifie le mélange. Les solutions de cholestérol dans les tweens ne demeurent fluides et limpides à la température ordinaire que pour des concentrations inférieures à la demi-saturation à 100° C.

Ce sont ces dernières solutions de cholestérol dans les différents tweens que nous avons mises en présence d'eau distillée.

Voici l'aspect des dispersions obtenues à la température de 20° C [156] :

Cholestérol (g p. 100)	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween (g p. 100)	3,3	2,5	2	1,6
$\frac{\text{Cholestérol} \times 100}{\text{tween}}$ = ...	3	4	5	6

Aspect des dispersions aqueuses

Tween 20	T	O	L	LL
— 40	T	T	O	L
— 60	T	T	O	L
— 80	T	T	T	O

T = transparent;
O = opalescent;
L = louche;
LL = très louche.

Nous constatons qu'avec les quatre agents étudiés, il est possible de réaliser des dispersions aqueuses transparentes de cholestérol, mais les quantités nécessaires pour assurer la solubilisation varient pour les différents tweens : le tween 20, dans lequel le cholestérol se montre relativement moins soluble, possède également le pouvoir solubilisant le plus faible.

Les résultats apparaissent identiques si l'on effectue la dispersion dans diverses solutions aqueuses isotoniques : eau physiologique ordinaire, solution de glucose à 50 g par litre, tampons phosphatés isotoniques. Ces constatations peuvent sembler être en opposition avec l'effet favorisant des sels observé sur la pénétration des films moléculaires par les agents actifs [185], les phénomènes d'émulsification [139] ou de solubilisation [79]. Notons que ces travaux ont été uniquement effectués avec des substances superficiellement actives ionisées. Mac Bain et Green [122], étudiant le pouvoir solubilisant d'un agent non ionisé vis-à-vis d'un colorant, ont toutefois noté que l'addition de 10 p. 100 de chlorure de potassium à la solution aqueuse augmentait notablement le rendement; les quantités de sels employées par ces derniers auteurs sont sans rapport avec celles utilisées dans nos propres expériences.

Les molécules de cholestérol, tout comme celles des tweens, possèdent une structure amphipathique, mais l'unique oxhydrile alcoolique secondaire est incapable d'entraîner en phase aqueuse la partie cyclique et la chaîne latérale, de caractère

nettement hydrophobe. Cette structure rend possible l'incorporation du cholestérol dans les micelles des substances superficiellement actives et la formation de micelles mixtes (fig. 1)

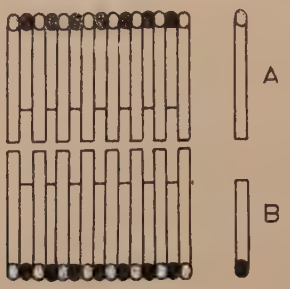


Fig. 1.

Micelle mixte réalisant la solubilisation aqueuse d'un composé non hydrosoluble à pôle hydrophile.

A = agent actif.

B = composé insoluble.

où les pôles hydrophiles des deux constituants sont dirigés vers la phase aqueuse solvante.

L'apport d'un élément insoluble dans la molécule primitive du tween doit diminuer son hydrophilie. C'est bien ce que nous avons constaté expérimentalement.

Les pseudosolutions aqueuses de cholestérol présentent des propriétés très voisines de celles des solutions de tweens seuls : par chauffage progressif, elles se troublent, puis se séparent également en deux phases, reprenant par refroidissement leur caractère initial de limpidité; mais la température à laquelle la pseudosolution de cholestérol commence à se troubler est plus basse que celle d'une simple solution de tween à la même concentration, la différence apparaissant d'autant plus nette que la quantité de cholestérol solubilisé est elle-même plus importante. Le relargage par les sels neutres s'effectue également pour des concentrations salines légèrement plus faibles.

La cohésion des parties lipophiles est plus marquée au contraire dans la micelle mixte. La solution aqueuse de tween, comme la pseudo-solution aqueuse de cholestérol, donnent toutes les deux une mousse abondante par agitation, mais la mousse est beaucoup plus persistante en présence de cholestérol, comme le montre l'expérience suivante ;

Expérience. — On introduit dans huit tubes à essais de diamètre intérieur de 10 mm, 3 cm³ de diverses solutions de tween 20 et 80, tamponnées à *p*H = 7, à la concentration de 6 p. 100 et contenant respectivement 0, 60, 120 et 180 mg de cholestérol pour 100 cm³ de la solution. Les tubes sont soigneusement bouchés et disposés horizontalement dans une machine à agiter où, pendant quatre minutes, ils subissent deux secousses par seconde. On dispose ensuite les tubes verticalement dans un porte tubes et l'on mesure la hauteur de la mousse après deux heures et demie et vingt-quatre heures. Les résultats sont indiqués dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Solution	Hauteur de la mousse (en millimètres)	
	Après 2 h. 30	Après 24 h.
Tween 80 6 p. 100 pur	2,5	0
— — + cholestérol 60 mg p. 100	4	0
— — + cholestérol 120 mg p. 100	4	0
— — + cholestérol 180 mg p. 100	7	3
Tween 20 6 p. 100 pur	3	0
— — + cholestérol 60 mg p. 100	3	0
— — + cholestérol 120 mg p. 100	4	1
— — + cholestérol 180 mg p. 100	9	3

Pour nous rendre compte de la stabilité des associations moléculaires hydrosolubles tween-cholestérol, nous avons cherché à extraire cet alcool stérolique par l'éther, un de ses meilleurs solvants, puis nous avons dosé le cholestérol par colorimétrie en utilisant la réaction de Lieberman-Burchardt.

Il était nécessaire, au préalable, de se rendre compte de l'influence éventuelle des différents tweens, eux-mêmes partiellement extractibles par l'éther, sur la réaction colorée de Lieberman-Burchardt. Nous avons adopté le protocole suivant :

Solution chloroformique de cholestérol (500 γ/cm³) ..... 2 cm³
Chloroforme ou solution chloroformique de tween (20 mg/cm³) ..... 2 cm³
Anhydride acétique ..... 2 cm³
Acide sulfurique pur ..... II gouttes.

On porte le mélange à l'obscurité et l'on mesure l'intensité de la coloration verte obtenue après trente minutes à l'électrophotomètre de Meunier. Les valeurs obtenues sont les suivantes :

	Unités Meunier ($\lambda = 6.000$ Å)
Témoin	150
Tween 20	142
Tween 40	145
Tween 60	145
Tween 80	151

Il est donc possible d'effectuer un dosage colorimétrique du cholestérol en présence de petites quantités de tween.

Nous avons alors mis en contact et agité à plusieurs reprises, pendant trois jours, 10 cm³ de solution renfermant 1.000 γ de cholestérol solubilisé dans l'eau distillée par des quantités variables des différents tweens, avec 15 cm³ d'éther. Il se produit en général une forte émulsion que l'on casse par centrifugation. On recueille l'éther : on épuise à nouveau la

TABLEAU VIII

QUANTITÉS DE CHOLESTÉROL EXTRAITES PAR L'ÉTHER DE 10 CM³ DE PSEUDOSOLUTIONS AQUEUSES RENFERMANT 1 MG DE CE STÉROL SOLUBILISÉ PAR DES QUANTITÉS VARIABLES DES DIFFÉRENTS TWEENS.

AGENT SOLUBILISANT	CHOLESTÉROL × 100 / TWEEN	CHOLESTÉROL EXTRAIT EN γ
Tween 20, 100 mg.....	1	240
— 50 mg.....	2	240
— 33 mg.....	3	235
Tween 40, 50 mg.....	2	190
— 33 mg.....	3	220
— 25 mg.....	4	215
Tween 80, 33 mg.....	3	250
— 25 mg.....	4	245
— 20 mg.....	5	200

phase aqueuse par 15 cm³ d'éther que l'on joint au précédent. La phase éthérée est évaporée, le résidu séché au dessiccateur à vide est repris par le chloroforme. Le liquide d'extraction chloroformique, filtré, est évaporé à son tour et l'on dose le cholestérol sur le résidu ainsi obtenu, en employant le même protocole que précédemment. Nos résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau VIII.

A peine le quart seulement du cholestérol contenu dans les pseudosolutions peut être cédé à l'éther : les associations moléculaires avec le tween apparaissent donc assez solides.

Des résultats tout-à-fait superposables ont été obtenus à partir de pseudosolutions aqueuses dont le *p*H variait de *p*H 4,8 à *p*H 8, grâce à l'adjonction de tampons. Nous avons remarqué que l'émulsion formée par agitation avec de l'éther était beaucoup moins abondante dans la région acide.

Nous avons réalisé, avec les pseudosolutions aqueuses de tweens-cholestérol, les mêmes essais de conservation qu'avec les solutions de tweens elles-mêmes : leur comportement vis-à-vis de la stérilisation et du vieillissement est analogue, les premières se montrant légèrement plus instables.

*
**

Dans le but de connaître le rapport entre la constitution chimique d'un composé insoluble dans l'eau et la possibilité de la solubilisation en milieu aqueux par les tweens, nous avons étudié la dispersion dans l'eau distillée d'un grand nombre de mélanges, en proportions variables, de tweens et de produits de constitution chimique simple [155].

Nous avons opéré de la manière suivante : on pèse avec précision une quantité de tween voisine de 2 g dans une fiole de Fourneau. On y ajoute une quantité connue du corps à solubiliser, que l'on essaie de dissoudre dans le tween, soit à la température du laboratoire, soit au bain-marie. Une fois la dissolution réalisée, on disperse le tout dans l'eau distillée, de manière à obtenir un volume final de 50 cm³. Ce liquide est divisé en trois parties qui sont conservées l'une à une température voisine de celle du laboratoire (étuve à + 20° C), la seconde à la glacière (+ 4° C), la troisième dans une étuve à cultures réglée à + 40° C. Nous avons, en effet, constaté que l'aspect de la dispersion était fortement influencé par la tempé-

rature; nous en verrons ultérieurement de nombreux exemples. On ne note qu'après vingt-quatre heures l'aspect des trois échantillons, car les phénomènes de solubilisation sont loin d'être instantanés.

Nous avons réuni dans le tableau IX les valeurs limites du rapport $R = \frac{\text{poids de la substance à solubiliser}}{\text{poids de tween 80}}$ permettant la réalisation de pseudosolutions parfaitement transparentes et stables. Nous discuterons maintenant les problèmes posés par la solubilisation de certains de ces composés.

Solubilisation des hydrocarbures

Les hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire que nous avons étudiés (décane, dodécane, octadécane, huile de paraffine (*)) se sont montrés peu solubles dans les différents tweens : même à chaud leur solubilité n'excède pas 2 p. 100. Lorsqu'on entraîne en phase aqueuse du tween saturé de l'un de ces hydrocarbures, on obtient une émulsion très instable qui se casse bientôt : les gouttelettes du produit insoluble viennent se rassembler à la surface du liquide.

Les hydrocarbures de la série benzénique, au contraire, se dissolvent beaucoup plus aisément dans les tweens : le benzène, le toluène et le xylène à froid, le naphtalène à chaud seulement. La solubilisation dans l'eau est d'autant meilleure que les dimensions moléculaires des composés aromatiques sont plus faibles : 100 parties de tween 80 dispersent en phase aqueuse 7 parties de benzène et 4 seulement de naphtalène, c'est-à-dire près de trois fois plus de molécules du premier carbure. Les hydrocarbures absolument dépourvus de tout groupement hydrophile doivent trouver place entre les feuillets internes de la micelle de l'agent actif, constitués ici par les chaînes des acides gras (fig. 2).

Pour le benzène, le toluène et le xylène, liquides à température ordinaire, la valeur limite du rapport R n'est pas influencée par la température. Pour le napthalène, au contraire, dont le point de fusion est notablement plus élevé

(*) Nous avons employé comme huile de paraffine le « Nujol », produit standardisé U. S. P., distribué en France par la Maison Théraplix.

TABLEAU IX

VARIATIONS DE LA VALEUR LIMITE, R ASSURANT LA RÉALISATION DE PSEUDOSOLUTIONS AQUEUSES TRANSPARENTES DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES ORGANIQUES PAR LE TWEEN 80.

SUBSTANCE ÉTUDIÉE	VALEUR DE R SELON LA TEMPÉRATURE D'OBSERVATION DE LA PSEUDOSOLUTION.		
	+ 4° C	+ 20° C	+ 40° C
Hydrocarbures :			
Benzène	0,07	0,07	0,07
Toluène	0,06	0,06	0,06
Xylène	0,06	0,06	0,06
Naphtalène	0,02	0,04	0,04
Alcools :			
Alcool heptylique	0,21	0,19	0,17
— octylique	0,12	0,13	0,11
— dodécylique	0,05	0,06	0,06
— stéarylique	0,02	0,02	0,03
Menthol	0,07	0,08	0,30
Phénols :			
α-Naphtol	0,09	0,11	0,09
β-Naphtol	0,12	0,12	0,11
Thymol	0,10	0,10	0,08
Phénolphtaléine	0,12	0,12	0,11
Acides :			
Acide oléique	0,06	0,06	0,06
Esters :			
Butyrate de butyle	0,08	0,08	0,08
Pélargonate d'éthyle	0,10	0,10	0,10
Oléate d'éthyle	0,15	0,15	0,15
Azoïques :			
Benzène azobenzène	0,07	0,07	0,10
Dérivés halogénés :			
Iodoforme	0,02	0,02	0,02

(F = 81° C), la solubilisation s'avère beaucoup plus difficile aux basses températures. C'est ce que l'on observe également pour le benzène-azo-benzène (F = 68° C).

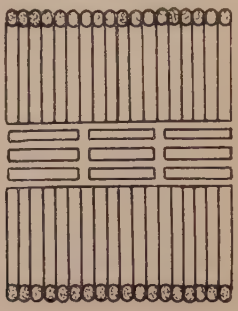


Fig. 2.

Solubilisation d'un hydrocarbure à l'intérieur de la micelle d'un agent superficiellement actif.

Solubilisation des alcools et des phénols

Les alcools aliphatiques se présentent comme des composés linéaires dont la chaîne est terminée par un groupement fortement hydrophile. Comme pour le cholestérol, nous aurons formation de micelles mixtes, où les composés non hydrosolubles pourront s'orienter par rapport au solvant aqueux.

Le pouvoir solubilisant des tweens décroît très fortement quand la chaîne méthylénique de l'alcool s'allonge et la solubilisation de l'alcool stéarylique, par exemple, donne une valeur de R plus faible que celle du naphtalène.

Nous avons étudié la solubilisation de l'alcool octylique par les quatre tweens hydrosolubles. Comme le montre le tableau X, dans lequel se trouvent les valeurs du rapport R limite pour trois températures différentes, les quatre agents actifs possèdent chacun un comportement particulier.

TABLEAU X

Valeurs limites du rapport R assurant la réalisation de pseudosolutions aqueuses transparentes d'alcool *n*-octylique par les tweens 20, 40, 60 et 80.

Agent actif	Température d'observation		
	+ 4° C	+ 20° C	+ 40° C
Tween 20	0,167	0,176	0,155
Tween 40	0,128	0,166	0,137
Tween 60	0,107	0,138	0,127
Tween 80	0,123	0,135	0,109

Le tween 20, ester laurique, est le meilleur agent solubilisant pour l'alcool *n*-octylique, alors que vis-à-vis du cholestérol il se montrait le moins efficace des quatre tweens. Il en est de même avec l'alcool *n*-heptylique.

Avec les alcools aliphatiques également, la présence d'électrolytes dans la phase aqueuse, aux faibles concentrations nécessaires pour rendre le milieu isotonique, n'influe pas sur la valeur limite du rapport R permettant l'obtention de pseudo-solutions transparentes. Lorsque cette valeur est dépassée, on note seulement alors que l'opalescence ou le trouble des solutions est plus accentué en présence de sels neutres.

La solubilisation de l'alcool *n*-octylique, quel que soit l'agent solubilisant, est meilleure à la température ambiante (20° C) qu'à une température de 40° ou de 4° C (tableau X). La baisse du pouvoir solubilisant associée à la hausse de la température se retrouve pour l'alcool heptylique et pour les quatre phénols étudiés. Elle semble être en rapport avec la diminution de l'hydratation des groupements hydrophiles des tweens quand la température s'élève et rompt les ponts hydrogènes (voir p. 10). Mais un autre phénomène, dépendant également de la température, vient interférer avec la déshydratation des groupements oxyéthyléniques, c'est l'état physique du tween, de la substance solubilisée et de leur association moléculaire. La nature du tween, aussi bien que celle du produit non hydrosoluble vont influer toutes les deux sur les modalités de solubilisation aux différentes températures. On remarquera, par

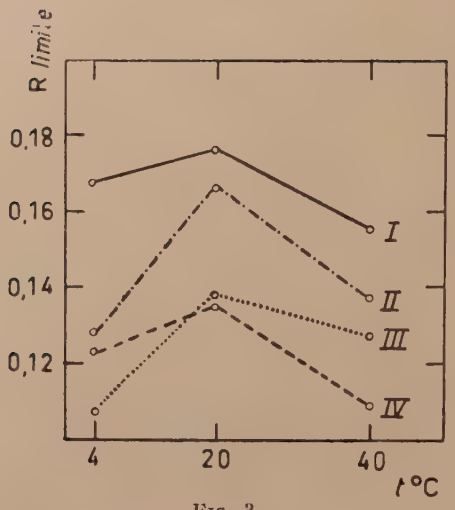


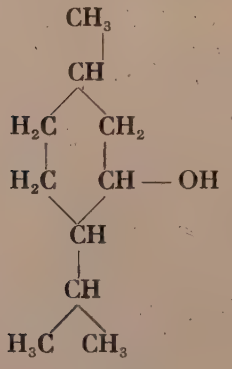
Fig. 3.

Influence de la température sur la solubilisation de l'alcool *n*-octylique par différents tweens.

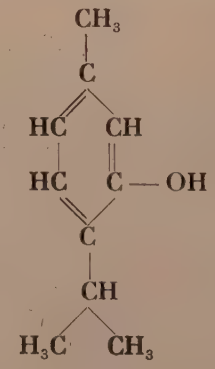
I = Tween 20.
II = Tween 40.
III = Tween 60.
IV = Tween 80.

exemple, sur le graphique de la figure 3, que la chute du pouvoir solubilisant à + 4° C se montre beaucoup plus sensible avec les tweens 40 et 60, esters palmitique et stéarique, qu'avec les tweens 20 et 80, plus fusibles.

Il faut noter la grande facilité de solubilisation du men-



Menthol

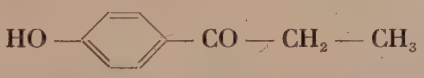


Thymol

thol à 40° C, température voisine de son point de fusion (F = 43° C). A cette température, le thymol, de structure très voisine, est beaucoup moins aisément solubilisé, bien que ce phénol soit beaucoup plus soluble dans l'eau que le menthol (*). On pourrait alléguer que le point de fusion du thymol (F = 49°3 C) est supérieur à celui du menthol, mais Winsor a montré que le thymol saturé d'eau fond à une température bien plus basse (F = 39°7 C) [223]. Nous aurons bientôt l'occasion de revenir sur ces faits d'apparence contradictoires et d'en proposer une explication.

La fonction phénolique, dans la micelle mixte, semble être dirigée du côté de la phase aqueuse et présenter sa réactivité habituelle. Nous avons remarqué que les pseudo-solutions aqueuses de phénolphtaléine, additionnées d'une trace de soude, se colorent fortement en rouge et redeviennent incolores par acidification. Les fonctions phénols de ce composé ne donnent lieu cependant à aucune réaction colorée par addition de perchlorure de fer.

D'autres composés phénoliques se laissent encore moins bien solubiliser dans l'eau que le thymol. Nous avons effectué quelques essais avec la parahydroxypropiophénone,



frénateur hypophysaire dont la solubilité dans l'eau (0,2 g p. 100), bien que supérieure à celle du thymol, se montre insuffisante pour l'utilisation thérapeutique par voie parentérale [104, 163]. Le rapport limite R, obtenu avec le tween 80, a pour valeur 0,04 (thymol 0,10), ce qui correspond à une solubilité maximum de 160 mg de produit dans 100 cm^3 d'une solution de tween à 4 p. 100. Cette valeur est inférieure à la solubilité dans l'eau distillée. Le tween 80 a donc diminué la solubilité dans l'eau du composé.

Un composé polyphénolique comme le phlobaphène de la cuticule d'Arachide [138] ne présente aucune solubilité dans les différents tweens.

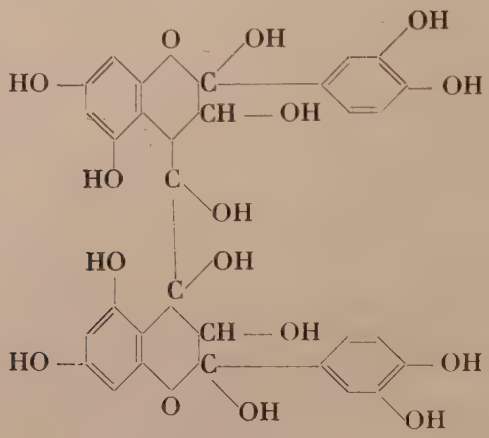
Rappelons que l'on extrait cette substance en épuisant les cuticules par de l'alcool à 95° C et en ajoutant de l'eau à la solution alcoolique extractive. On obtient un précipité rouge

---

(*) Solubilité dans l'eau distillée à 20° C :

Menthol	0,04 g p. 100
Thymol	0,085 g p. 100

qui constitue le phlobaphène. La structure chimique de ce composé est voisine de celle du tannoïde dont il dérive par chauffage en milieu acide.



Tannoïde de l'Arachide

Nous verrons plus loin les raisons de son insolubilité.

Solubilisation des acides et des esters

Si la solubilisation de l'acide oléique par les tweens ne présente aucune particularité notable, il nous semble intéressant de signaler nos tentatives infructueuses de solubilisation de l'acide phloïonique (*). Cet acide gras, extrait du liège, possède, comme l'acide oléique, une chaîne de dix-huit carbones, mais c'est un diacide qui présente en outre, au milieu de la chaîne méthylénique, deux fonctions alcools secondaires :

$$HOOC — (CH_2)_7 — CHOH — CHOH — (CH_2)_7 — COOH$$

Même à chaud, il nous a été impossible de dissoudre cette substance dans nos quatre tweens hydrosolubles. Il en est de même des acides 9-10 dihydroxystéarique, sébacique (diacide en C_{10}) et urique.

Notons, enfin, les différences importantes entre les modalités de solubilisation de l'acide oléique et de son ester éthy-

(*) Ce produit nous a été aimablement donné, grâce à l'intermédiaire de M. le Professeur Giberton, par M. Césaire, Chef de Travaux à la Faculté de Médecine d'Alger, qui a effectué une étude approfondie de cet acide gras [27].

lique, ce dernier corps nécessitant, pour être amené en phase aqueuse, sous forme de pseudosolution transparente, une quantité de tween à peine égale à la moitié de celle nécessaire pour solubiliser l'acide gras correspondant.

B. — Solubilisation en milieu hydroalcoolique

De nombreux composés organiques non hydrosolubles se dissolvent facilement dans les solvants organiques et en particulier dans l'alcool éthylique. Les tweens 20, 40, 60 et 80, dont les éléments constitutifs principaux, acides gras et chaînes polyoxyéthyléniques, sont solubles dans ce solvant, se dissolvent eux aussi parfaitement dans l'éthanol ainsi que dans toute la gamme des mélanges éthanol-eau.

Nous avons profité de ces particularités pour étudier le phénomène de solubilisation par une technique différente de la précédente, technique qui nous a semblé pouvoir préciser davantage le mécanisme des associations moléculaires entre les tweens et les substances non hydrosolubles.

Lorsqu'on dilue progressivement, avec de l'eau, une solution alcoolique d'une substance non hydrosoluble, on constate que la solution, d'abord transparente, se trouble bientôt lorsque le titre en alcool diminue et dépasse une valeur limite compatible avec la dispersion complète de la substance non hydrosoluble qui précipite alors. La quantité d'eau nécessaire pour obtenir le trouble dépend du volume initial de la solution alcoolique, de la teneur de cette solution en substance non hydrosoluble et de la température. Lorsque les conditions sont précisées, le volume d'eau qui amène le début de la précipitation de la substance (que nous appellerons l' « indice de dilution aqueuse ») ne dépend plus que de la constitution chimique de ce composé dont il reflète la balance hydrophile-lipophile. Nous avons étudié les variations de l'indice de dilution aqueuse lorsqu'on ajoute à la solution alcoolique de la substance des quantités variables de différents tweens.

Solubilisation comparée des alcools et des phénols

Nous avons signalé plus haut que, dans certaines conditions tout au moins, le tween solubilisait plus facilement le menthol que le thymol, alors que les dimensions moléculaires de ces deux composés sont très voisines et que le menthol est moins soluble dans l'eau que le thymol. Nous avons entrepris une

étude détaillée de l'indice de dilution aqueuse pour ces deux systèmes.

1° *Solubilisation du menthol :*

a) *En milieu hydroéthanolique.* — Le protocole suivant a été adopté. On introduit dans un gros tube à centrifuger cylindrique, de 40 cm³ de capacité :

Solution 0,3 M de menthol dans l'éthanol à 97° ..... 2 cm³.
Alcool éthylique à 97° ..... 4 cm³.

On ajoute ensuite, en agitant constamment, de l'eau distillée, par demi-centimètre cube, jusqu'à l'apparition du louche, et l'on continue ensuite la dilution jusqu'à l'addition de 30 cm³ d'eau au total. On effectue des essais analogues en remplaçant les 4 cm³ d'éthanol par des quantités variables de solutions alcooliques de tween, le volume total de la solution éthanolique étant toujours de 6 cm³. Après chaque essai, on note l'aspect de la solution dont le titre en alcool est d'environ 16°. Nous avons constaté qu'une dilution plus importante se montrait sans effet.

Nous avons groupé nos résultats expérimentaux dans le tableau XI. Dans la limite de nos conditions expérimentales, la solubilisation complète du menthol est possible avec les tweens 40, 60 et 80. La quantité d'agent actif nécessaire pour obtenir une dispersion transparente est, dans les trois cas, de 300 mg environ, ce qui correspond à une valeur de R = 0,31 (*).

Nous constatons, en outre, avec ces trois tweens, un nouveau phénomène. L'indice de dilution aqueuse, dont la valeur est de 10,5 pour le menthol à 20° C, baisse d'abord progressivement pour les plus faibles proportions d'agent actif, cette baisse étant surtout marquée pour le tween 80, puis les valeurs de l'indice remontent avec l'augmentation de la concentration en tween, dépassent bientôt la valeur initiale (correspondant au menthol pur) et pour une quantité suffisante de tween, le mélange, complètement dilué, reste clair. Nous n'observons pas la solubilisation complète avec les quantités de tween 20

(*) Nos expériences ont été réalisées à une température voisine de 20° C. Nous avons constaté que les pseudosolutions transparentes de menthol en milieu hydroalcoolique étaient très sensibles à la température. Comme pour la solubilisation directe (voir p. 43), la valeur limite du rapport R dépend de la température de conservation des solutions.

employées, mais, néanmoins, les variations de l'indice de dilution aqueuse présentent la même allure.

TABLEAU XI

SOLUBILISATION DU MENTHOL PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	10,5	10,5	10,5	10,5
10	.....	.....	.....	7
20	.....	.....	8,5	6
30	.....	.....	8	5,5
40	.....	.....	.....	5
50	8	9	9,5	5
60	.....	.....	.....	4,5
70	.....	.....	.....	4,5
80	.....	.....	.....	4,5
90	.....	.....	.....	8,5
100	8	10	10,5	9
110	9	10,5	.....	9,5
200	10	11,5	12,5	12
250	11	14	17	18
300	13	∞	∞	∞
350	15	.....	.....	.....
400	17	.....	.....	.....

∞ = Solubilisation complète.

Il existe donc des associations moléculaires entre le menthol et les tweens moins solubles en milieu hydroalcoolique que le menthol lui-même, et dont l'existence se traduit par une zone dans laquelle l'indice de dilution aqueuse est plus faible que celui du composé non hydrosoluble (fig. 4). De telles associations ne peuvent évidemment pas être mises en évidence par la première technique que nous avons employée; l'étude de la solubilisation directe du menthol dans les tweens et de la

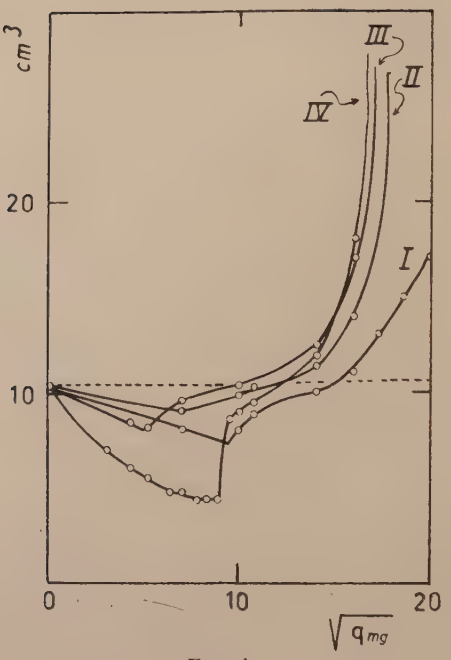


Fig. 4.

Indice de dilution aqueuse du menthol en présence des différents tweens hydrosolubles.

I = Tween 20.
II = Tween 40.
III = Tween 60.
IV = Tween 80.

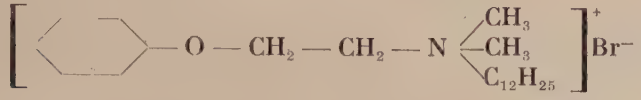
(Milieu hydroéthanolique.)

dispersion des mélanges en phase aqueuse ne peut révéler que les associations moléculaires hydrosolubles.

Observe-t-on un phénomène analogue en utilisant comme agent de solubilisation d'autres substances superficiellement actives que les tweens ? Nous avons examiné à cet effet, en adoptant exactement le même protocole opératoire que précédemment, le comportement de deux composés anioniques, le laurylsulfate de sodium et le laurate de guanidine. Nous avons choisi ce dernier savon de préférence aux sels alcalins habituels, à cause de sa bonne solubilité dans l'alcool [157]. Nous avons utilisé également un détergent cationique, le bradosol (*)

(*) Une préparation particulièrement pure de ce composé nous a été gracieusement fournie par les Laboratoires Ciba.

bromure de β-phénoxyéthyldiméthyl-dodécylammonium, également soluble dans l'alcool.



On trouvera dans le tableau XII les valeurs de l'indice de dilution aqueuse correspondant à ces trois agents actifs. Nous remarquons qu'il ne se produit jamais, avec eux, d'association moins soluble que le menthol lui-même (fig. 5). Leur existence semble donc être en rapport avec la présence, dans la molécule de tween, de groupements oxyéthyléniques inexistant chez les agents ionisés.

Lorqu'on introduit une petite quantité de tween dans une solution éthanolique de menthol, les molécules de ce dernier

TABLEAU XII

SOLUBILISATION DU MENTHOL PAR DIFFÉRENTES SUBSTANCES ACTIVES IONISÉES EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ D'AGENT ACTIF (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISÉ EMPLOYÉ		
	Laurylsulfate de sodium	Laurate de guanidine	Bradosol
0	10,5	10,5	10,5
10	11	10,5	10,5
20	11	11	10,5
30	11,5	11,5	10,5
40	12 (*)	11,5	10,5
50	.....	12	10,5
60	.....	12	10,5
80	.....	12,5	11
100	.....	16,5	13,5
200	.....	∞	22
250	.....	.....	∞

∞ = Solubilisation complète.

(*) La faible solubilité du laurylsulfate de sodium dans l'alcool ne permet pas l'emploi de quantités supérieures de ce produit.

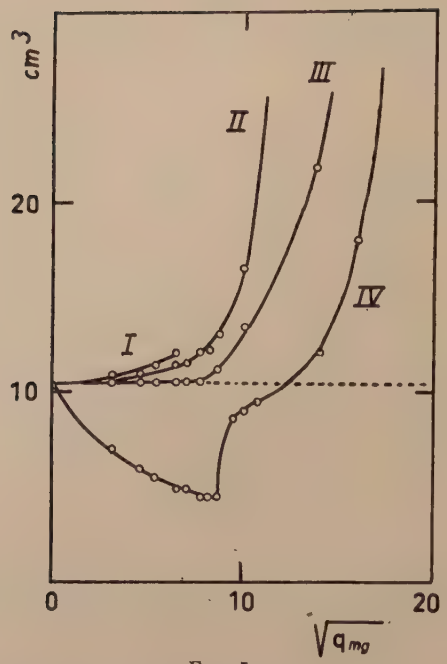


FIG. 5.

Indice de dilution aqueuse du menthol en présence de différentes substances superficiellement actives.

I = Laurylsulfate de sodium.
II = Laurate de guanidine.
III = Bradosol.
IV = Tween 80.

(Milieu hydroéthanolique.)

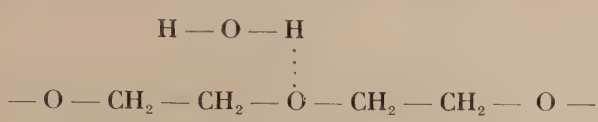
composé, tout comme celles du solvant, viennent s'unir aux atomes d'oxygène des chaînes polyoxyéthyléniques grâce à la formation de liaisons hydrogène :

$$\text{Menthol} - O - H \cdots O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O -$$

et

$$C_2H_5 - O - H \cdots O - CH_2 - CH_2 - O - CH_2 - CH_2 - O -$$

Quand on dilue la solution éthanolique, les molécules d'eau vont entrer en compétition avec les molécules des deux alcools pour former également des liaisons hydrogène.



La proportion relative des molécules d'eau, d'éthanol et de menthol fixées sur une chaîne polyoxyéthylénique sera déterminée par la proportion relative des quantités d'eau et d'éthanol en présence (titre alcoolique de la solution), par la concentration du milieu en menthol et par les valeurs des énergies des trois types de liaisons hydrogène, le système présentant toujours l'énergie libre la plus faible. Il semble également très probable que les dimensions moléculaires et la structure des alcools unis à l'atome d'oxygène du groupement $-CH_2-CH_2-O-$ puissent influer, par un phénomène d'empêchement stérique, sur l'arrivée des molécules d'eau jusqu'à ces mêmes atomes d'oxygène.

Etudions maintenant plus en détail la solubilisation du menthol par le tween 80 par exemple, composé dont le groupement hydrophile est constitué de vingt groupes d'oxyde d'éthylène et dont le poids moléculaire est voisin de 1.060. Dans notre protocole expérimental, la quantité de menthol employée est constante (2 cm^3 de solution 0,3 M, soit 0,6 mM). La quantité de tween varie de 0 à 300 mg, c'est-à-dire de 0 à 0,28 mM. Pour les faibles concentrations en tween, on obtiendra donc des associations moléculaires très riches en menthol. Dans de telles associations, la fonction hydrophile du menthol se trouve masquée par l'union de ce composé avec l'oxygène du groupement oxyéthylénique. D'autre part, l'hydrophilie du tween, dont une grande partie des oxygènes oxyéthyléniques ne peuvent s'hydrater, est insuffisante pour disperser l'association en milieu hydro-alcoolique. On observera donc une valeur faible de l'indice de dilution aqueuse, valeur inférieure à celle du menthol lui-même.

Lorsqu'on augmente la quantité d'agent actif, on modifie la composition moléculaire des associations : il y a de moins en moins de molécules de menthol fixées sur une molécule de tween; la balance hydrophile-lipophile des associations penche vers l'hydrophilie et, pour une valeur suffisante, les associations deviennent entièrement hydrosolubles. Le pouvoir solubi-

lisant du tween apparaît important, car les associations dispersibles sous forme de solution transparente se produisent alors qu'il existe dans le milieu deux fois plus de molécules de menthol que de molécules d'agent actif.

Les courbes de variations de l'indice de dilution aqueuse en fonction de la quantité d'agent actif, présentent, avec les quatre tweens, une discontinuité très nette qui traduit l'existence de deux phénomènes bien distincts. Une première région se situe à gauche du point de rebroussement : c'est le domaine de formation des associations moléculaires peu solubles, dont le nombre est d'autant plus élevé que l'on introduit plus de molécules de tween. L'indice de dilution aqueuse, à partir de la valeur correspondant au menthol, baisse d'abord rapidement puis plus lentement (courbe à concavité supérieure) : si les associations moléculaires sont de plus en plus nombreuses, elles sont de moins en moins riches en menthol. La deuxième région, à droite de la précédente, est celle où l'agent actif réussit à hydrater un nombre suffisant de groupements oxyéthyléniques et manifeste ainsi ses propriétés solubilisantes.

En comparant le rapport R limite permettant d'obtenir une dispersion aqueuse transparente de menthol dans l'eau distillée et dans une phase hydro-alcoolique de faible titre en alcool (16°), nous remarquons que la présence d'alcool favorise nettement la solubilisation par les tweens. Dans le tableau XIII nous avons donné les valeurs numériques de R, obtenues par la technique de solubilisation directe ou la tech-

TABLEAU XIII

Valeur limite de R en milieu aqueux ou en milieu hydroéthanolique (titre 16°), pour la solubilisation de diverses substances par le tween 80 (T = 20° C).

Substance solubilisée	Valeur de R	
	Eau distillée	Ethanol à 16°
Menthol	0,08	0,31
Thymol	0,10	0,10
n-Octanol	0,13	0,48
Acide oléique	0,06	0,17
Oléate d'éthyle	0,15	0,25
Azobenzène	0,07	0,10

nique de l'indice de dilution aqueuse pour le menthol et plusieurs autres substances.

L'influence favorisante de l'alcool ne se retrouve pas dans la solubilisation par les substances superficiellement actives ionisées : Green et Mc Bain [79] ont montré que les savons alcalins ordinaires voyaient leur pouvoir solubilisant partiellement inhibé par la présence d'alcool.

b) *En milieu hydrométhanolique.* — En conservant le même protocole que précédemment, nous avons effectué une série d'essais en partant de solutions de menthol et de tween dans le méthanol. L'indice de dilution aqueuse de menthol dans le méthanol est de 7; cette valeur, plus faible que celle obtenue en milieu éthanolique, traduit la plus faible solubilité dans l'alcool méthylique. Cependant, les quantités de tween 20 et 80 nécessaires pour amener la solubilisation complète sont plus faibles que dans les expériences précédentes, comme l'indique le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Solubilisation du menthol par les tweens 20 et 80 en milieu hydrométhanolique (T = 20° C).

Quantité d'agent actif (q *mg*)	Indice de dilution aqueuse selon l'agent solubilisant employé	
	Tween 20	Tween 80
0	7	7
2,5	6,5	5,5
5	6	3,5
10	5	3
20	4	5,5
50	3,5	6
150	6,5	8,5
200	7,5	12
300	10	∞
350	11,5	.....
400	∞	.....

∞ = Solubilisation complète.

Nous observons ici encore des associations moléculaires tween-menthol moins solubles que le menthol lui-même. Les courbes des variations de l'indice de dilution aqueuse présentent une allure très voisine quel que soit le solvant, alcool méthylique ou éthylique (fig. 6 et fig. 4, courbe IV). On note en particulier, dans les deux cas, la discontinuité que nous avons signalée plus haut.

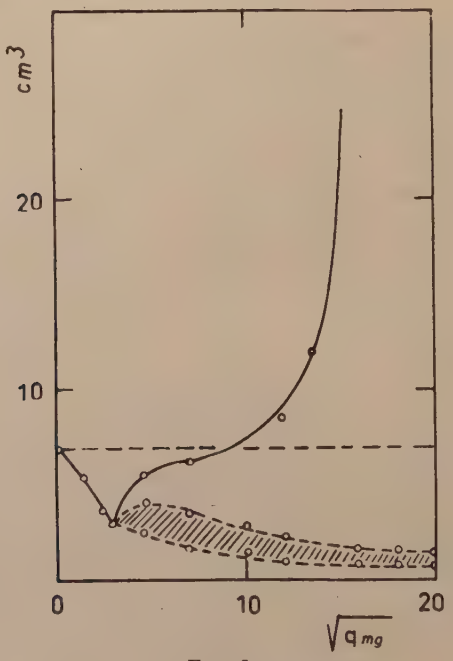


FIG. 6.

Indice de dilution aqueuse du menthol, en présence du tween 80. (Milieu hydrométhanolique.)

Au cours des mesures de l'indice de dilution aqueuse mettant en jeu l'alcool méthylique, nous avons remarqué qu'en présence d'une quantité suffisante de tween (région à droite de la discontinuité), l'addition d'une faible quantité d'eau à la solution méthanolique provoque un trouble très net, mais que le milieu redevient rapidement limpide dès que l'on poursuit la dilution. Sur la figure 6, nous avons représenté en pointillés les deux lignes correspondant à l'apparition et à la disparition de ce louche qui ne persiste que dans un étroit

domaine de titre alcoolique de la solution (zone hachurée). Selon la concentration en agent actif, la dilution complète s'accompagne, ou non, d'un nouveau trouble dont l'apparition chiffre la valeur de l'indice de dilution aqueuse.

Nous avons proposé plus haut une interprétation du mécanisme de la solubilisation par les tweens. Lorsque le composé non hydrosoluble peut donner des liaisons hydrogène, il se fixe au niveau des groupements polyoxyéthyléniques de l'agent actif dont il perturbe l'hydratation. Pour certaines proportions, on observe des associations moléculaires moins hydrosolubles encore que le composé initial.

Si notre interprétation est correcte, l'entraînement en milieu aqueux, sous forme d'une pseudo-solution transparente, d'un composé insoluble dans l'eau, sera d'autant plus difficile à réaliser que le composé se liera plus facilement au tween par des liaisons hydrogène. C'est ce que nous avons effectivement observé en étudiant la solubilisation en milieu hydro-alcoolique du thymol et de différents phénols, d'une part, de composés halogénés, d'autre part.

2° *Solubilisation du thymol :*

a) *En milieu hydroéthanolique.* — Le thymol ne diffère du menthol que par le caractère aromatique de son cycle qui confère à l'oxhydrile une nature phénolique. Les phénols forment des liaisons hydrogène plus fortes que les alcools correspondants, par suite de l'augmentation de l'électro-négativité de l'atome d'oxygène, due pour Pauling à des phénomènes de résonance [160].

Pour étudier la solubilisation du thymol comparativement à celle du menthol, nous avons conservé strictement le même protocole opératoire. Nous remarquons tout d'abord (tableau XV) que l'indice de dilution aqueuse du thymol est nettement supérieur à celui du menthol. La première substance est en effet plus soluble dans l'eau. Nous observons que l'introduction de tween entraîne l'apparition d'associations moléculaires moins solubles que le thymol, et proportionnellement beaucoup moins solubles que celles données dans les mêmes conditions par l'alcool diterpénique. De plus, le domaine d'existence de ces associations insolubles est beaucoup plus étendu et l'on doit ajouter une quantité considérable de tween pour retrouver des associations hydrosolubles,

comme le montre l'examen comparatif des tableaux XI et XV. Nous avons représenté sur la figure 7 les courbes des variations de l'indice de dilution aqueuse au cours de la solubilisation par le tween 80 du menthol et du thymol. Dans les deux cas, l'allure générale des courbes est analogue.

TABLEAU XV

Solubilisation du thymol par les tweens 20, 40, 60 et 80 en milieu hydroéthanolique (t = 20° c).

Quantité de tween (q *mg*)	Indice de dilution aqueuse selon l'agent solubilisant employé			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	17	17	17	17
1	9,5	.....	8	8,5
3	.....	.....	.....	7
5	.....	.....	.....	6
8	.....	.....	.....	5,5
20	7	.....	4,5	.....
30	.....	.....	.....	4,5
50	6	4,5	3,5	4
100	5	3,5	.....	.....
150	.....	4	.....	.....
200	5	7	7,5	3,5
280	.....	.....	.....	6,5
300	5	8,5	8,5	7
400	6,5	13	9,5	8,5
562	.....	.....	.....	10,5
843	.....	.....	.....	20
1.124	.....	.....	.....	∞

∞ = Solubilisation complète.

Le mécanisme de la solubilisation est donc le même. Mais comme l'énergie de la liaison hydrogène avec l'oxygène des groupements $-CH_2-CH_2-O-$ est plus élevée avec le composé phénolique, la proportion relative des molécules de thymol fixées par une molécule de tween sera plus importante.

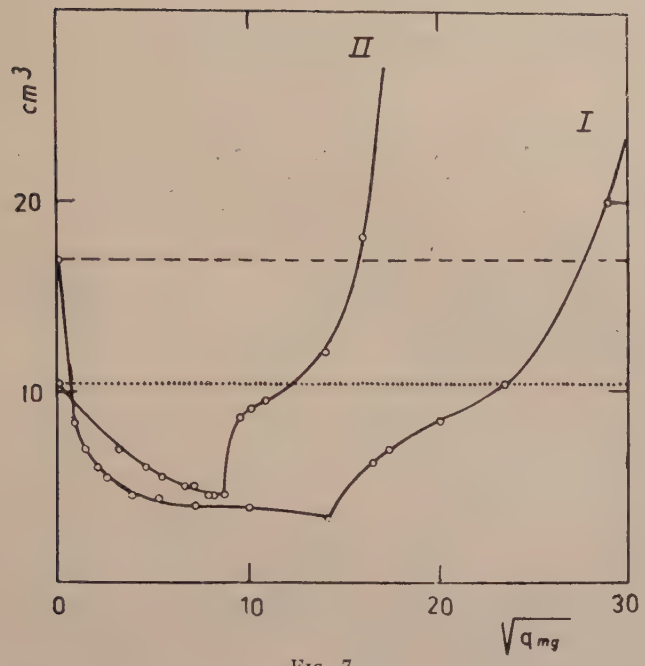


Fig. 7.

Indice de dilution aqueuse du thymol (I) et du menthol (II) en présence de tween 80. (Milieu hydro-éthanolique.)

Ici la compétition entre l'eau, l'éthanol et le thymol sera davantage en faveur de ce dernier composé. La plus grande aptitude du thymol à donner ces liaisons hydrogène explique également pourquoi cette substance est plus soluble dans l'eau que le menthol. Nous observons donc, dans le phénomène de solubilisation par des agents actifs à chaîne polyoxyéthylénique, un aspect qui semblerait à priori paradoxal : la solubilisation d'une substance peu soluble dans l'eau apparaît, toutes autres conditions égales, d'autant moins facile que la substance est plus soluble dans l'eau. Le même mécanisme conditionne à la fois l'hydrophilie de la substance examinée et son aptitude à donner des associations moléculaires insolubles avec les tweens, associations dans lesquelles les seuls groupements susceptibles de s'hydrater dans les deux types de molécules se neutralisent réciproquement.

Le thymol est d'ailleurs capable de fournir des complexes

insolubles relevant du même mécanisme avec d'autres composés polyoxyéthyléniques. L'addition à la solution alcoolique de thymol de divers polyoxyéthylèneglycols :

$$CH_2\,OH - (CH_2 - O - CH_2)_{\overline{n}} - CH_2\,OH$$

ou de méthoxypolyoxyéthylèneglycols :

$$CH_3 - O - CH_2 - (CH_2 - O - CH_2)_{\overline{n}} - CH_2\,OH$$

abaisse légèrement l'indice de dilution aqueuse. La centrifugation des solutions louches fournit un précipité gélatineux fort différent du précipité cristallin de thymol. L'emploi de quantités importantes de ces glycols ne permet cependant pas d'assurer la solubilisation du thymol dans l'eau. Ceci montre bien que la solubilisation ne peut être réalisée que par l'englobement du composé insoluble dans les micelles d'un agent actif, à l'intérieur desquelles il peut dissimuler sa partie hydrophobe.

La différence de comportement entre le thymol et le menthol peut encore être mise en évidence par l'expérience suivante : une solution aqueuse saturée de menthol reste constamment limpide quand on lui ajoute des quantités croissantes de tween; dans les mêmes conditions, au contraire, une solution aqueuse saturée de thymol commence par se troubler, puis le précipité se redissout quand la concentration en agent actif atteint une valeur suffisante (tableau XVI).

TABLEAU XVI

PRÉCIPITATION DU THYMOL EN SOLUTION AQUEUSE PAR LE TWEEN 80.

Solution de tween 80 à 5 p. 100 (en cm³).	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Solution saturée de thymol (en cm³)....	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aspect du mélange	Cl	↙	↙	↙	Cl	Cl	Cl

Le rôle joué par les ponts hydrogène au cours de la solubilisation par les agents actifs à chaîne oxyéthylénique se trouve confirmé lorsqu'on étudie la dispersion du thymol en phase aqueuse par d'autres agents actifs appartenant à des familles différentes. Nous avons utilisé, comme pour le menthol, le laurylsulfate de sodium, le laurate de guanidine et le

bradosol (tableau XVII). Nous observons que l'indice de dilution aqueuse croît régulièrement lorsqu'on augmente la

TABLEAU XVII

Solubilisation du thymol par différentes substances actives ionisées en milieu hydroéthanolique (t = 20° c).

Quantité d'agent actif (q *mg*)	Indice de dilution aqueuse selon l'agent solubilisant employé		
	Laurylsulfate de sodium	Laurate de guanidine	Bradosol
0	17	17	17
10	17,5	17,5	15,5
20	22,5	18	14
30	.....	18,5	15
40	.....	21,5	15,5
50	.....	27,5	.....
100	.....	∞	16,5
200	.....	.....	18
300	.....	.....	21
400	.....	.....	27

∞ Solubilisation complète.

concentration des deux premières substances superficiellement actives et que la solubilisation du thymol s'obtient avec des quantités de produits bien plus faibles que celles nécessaires pour disperser le menthol. Les phénols ne peuvent donc pas constituer avec ces substances actives ionisées d'associations peu solubles. Le bradosol occupe une place intermédiaire entre les tweens et les deux détergents anioniques. La baisse légère de l'indice de dilution aqueuse qu'il provoque traduit le blocage de la fonction hydrophile du thymol. Ceci ne doit pas nous surprendre, car il existe dans le bradosol un atome d'oxygène qui possède les même propriétés que l'oxygène des groupements oxyéthyléniques des tweens : c'est l'oxygène du groupement phénoxyéthyl. Son électro-négativité est assez forte à cause de la proximité du noyau benzénique. Cet atome d'oxygène s'unira, par une liaison hydrogène, à une molécule d'eau

ou à une molécule de thymol. La différence de comportement entre le bradosol ou les tweens semble uniquement en rapport avec l'existence, dans ces derniers produits, de très nombreux groupements oxyéthyléniques et non pas d'un seul, comme dans le saponium étudié.

Les résultats du tableau XVII sont reportés sur les courbes de la figure 8.

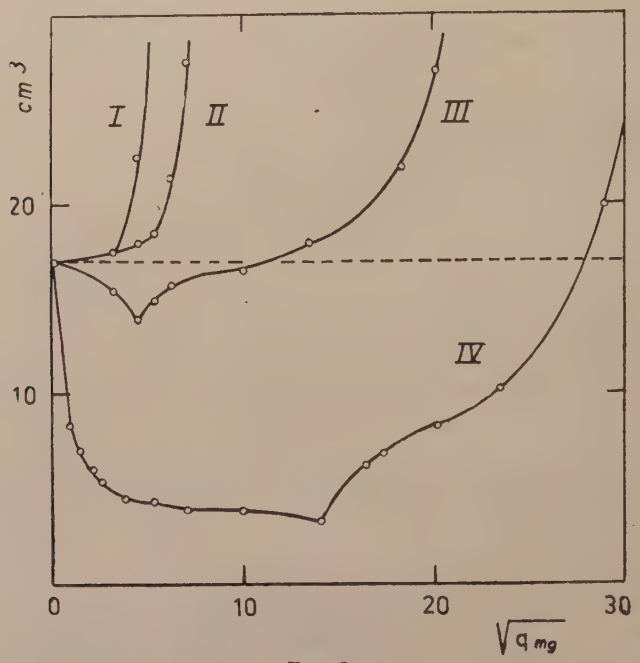


Fig. 8.

Indice de dilution aqueuse du thymol en présence de diverses substances superficiellement actives.

I = Laurylsulfate de sodium.
II = Laurate de guanidine.
III = Bradosol.
IV = Tween 80.

(Milieu hydroéthanolique.)

b) *En milieu hydrométhanolique.* — Le remplacement de l'alcool éthylique par son homologue inférieur conduit aux mêmes résultats que ceux déjà observés avec le menthol (tableaux XIV et XVIII) :

— Indice de dilution aqueuse plus faible en milieu méthanolique;

— Meilleure solubilisation (quantités de tween nécessaires pour obtenir la solubilisation plus faibles).

En présence du méthanol, il se produit souvent, au début de la dilution, comme nous l'avons signalé plus haut, un louche dont le domaine de stabilité apparaît très étroit (figure 9, région hachurée).

TABLEAU XVIII

SOLUBILISATION DU THYMOL PAR LES TWEENS 20, 40 ET 80 EN MILIEU HYDROMÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ D'AGENT ACTIF (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISANT EMPLOYÉ		
	Tween 20	Tween 40	Tween 80
0	14	14	14
2,5	5	.....	4
5	4	.....	2,5
10	3,5	.....	2,5
20	3	.....	2,0
40	.....	.....	1,5
50	.....	4,5	.....
100	2,5	1,5	1,5
200	.....	.....	1
300	2	4	4,5
400	4	4,5	5,5
500	5	7	6,5
600	6	8	.....
700	.....	14,5	12,5
800	9	∞	∞

∞ Solubilisation complète.

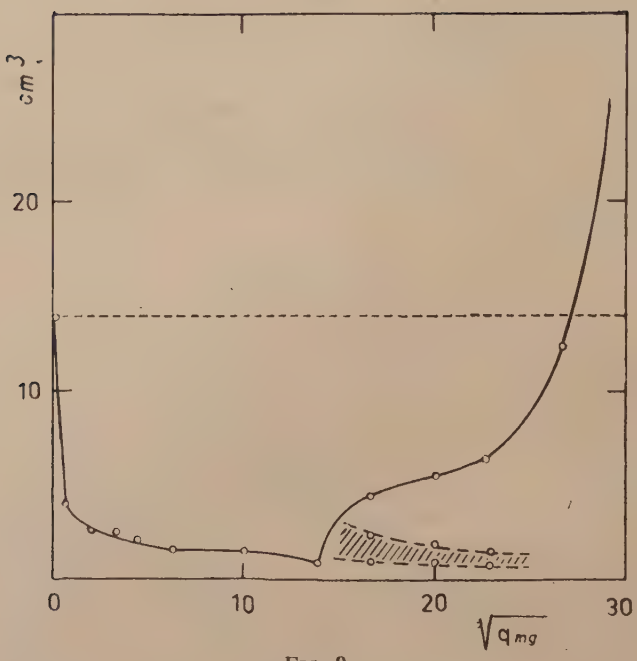


Fig. 9.

Indice de dilution aqueuse du thymol en présence de tween 80. (Milieu hydrométhanolique.)

3° *Solubilisation de divers phénols.*

Des résultats très similaires s'observent lorsqu'on essaie de solubiliser d'autres composés phénoliques insolubles ou peu solubles dans l'eau. Nous avons noté la formation d'associations moléculaires peu solubles dans l'alcool à 16° pour les systèmes tween 80 — α-naphtol, tween 80 — β-naphtol, tween 80 - phénolphtaléine, tween 60 - phénolphtaléine.

L'action sur les tweens des dérivés polyphénoliques est encore plus saisissante. Nous avons relaté plus haut les essais infructueux de solubilisation directe du phlobaphène de l'Arachide dans les différents tweens. La solubilisation en milieu hydroalcoolique n'est pas plus réalisable, car la simple addition de tween dans une solution alcoolique de phlobaphène provoque aussitôt la formation d'un abondant précipité. Le phlobaphène est en effet un produit polymérisé, de poids moléculaire élevé, qui peut donc attirer par ses fonctions phénoliques nombreuses un grand nombre de molécules de tweens.

Le même précipité s'observe avec d'autres substances superficiellement actives non ionisées de structure polyoxyéthylénique, dérivé polyoxyéthylénique d'alcool laurique (Brij 35) ou dérivé polyoxyéthylénique d'acide stéarique (G 2.153). Bien plus, le phlobaphène est même capable d'insolubiliser, en milieu alcoolique, les simples polyoxyéthylèneglycols, le précipité étant d'autant plus abondant que le poids moléculaire de ces derniers composés est élevé.

Solubilisation comparée de composés halogénés

Nous avons pensé que la série des composés halogénés du méthane pourrait nous apporter de nouvelles preuves en faveur du rôle des liaisons hydrogène dans la formation des associations moléculaires avec les tweens. Plusieurs auteurs ont en effet montré que la réactivité des composés halogénés du type CX_4 était beaucoup plus faible que celle des composés de structure CX_3H, composés dans lesquels l'hydrogène peut facilement s'unir à un atome électro-négatif d'une autre molécule. Wyatt, le premier [224], par des mesures cryoscopiques, montre la facilité d'association dans le système CHX_3-cétones. Les résultats furent confirmés par Mc Leod [134] qui utilise des techniques viscosimétriques. Le même auteur, avec Wilson [135], montra que la chaleur de mélange des systèmes dérivés halogénés-éthers glycoliques conduisait à admettre l'existence d'associations entre les composés trihalogénés et l'oxygène des groupements éther. La formation de ponts hydrogène fut également admise par Glasstone [74], à la suite de mesures de la constante diélectrique des mélanges précédents. Les ponts hydrogène peuvent d'ailleurs être révélés par la spectrographie infra-rouge [77]. Signalons, enfin, les travaux plus récents de Zellhoefer et collaborateurs [226, 227].

Nous avons donc étudié parallèlement la solubilisation du tétrachlorure de carbone et du chloroforme par les tweens. Le protocole suivant, voisin de celui précédemment adopté (voir p. 50), nous a semblé, après plusieurs essais, le plus approprié à l'examen comparatif des résultats :

Solution 3 M du composé halogéné dans l'alcool méthylique.	1,5 cm³.
Alcool méthylique à 97°	4,5 cm³.

L'eau distillée est ajoutée progressivement au milieu rendu homogène par une agitation convenable. On note l'apparition éventuelle du louche ainsi que l'aspect du milieu après addi-

tion d'un total de 30 cm³ d'eau. L'alcool méthylique est remplacé ensuite par le même volume de solution de tween dans ce même solvant, à différentes concentrations. Nous avons groupé nos résultats expérimentaux dans les tableaux XIX et XX, complétés par les courbes des figures 10 et 11.

TABLEAU XIX

Solubilisation du tétrachlorure de carbone par les tweens 20, 40, 60 et 80 en milieu hydrométhanolique (t = 20° c).

Quantité de tween (q *mg*)	Indice de dilution aqueuse selon l'agent solubilisant employé			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	1,5	1,5	1,5	1,5
100	1,5	1,5	1	1
200	.....	1	1	.....
300	1,5	1	3,5	1
400	1,5	1	4	3,5
500	1,5	3,5	Opal.	Opal.
600	1,5	4	Opal.	Opal.
700	2	Opal.	Opal.	∞
800	3	Opal.	.....	.....
900	4	Opal.	.....	.....
1.200	5	.....	.....	.....
1.400	6,5	.....	.....	.....
1.600	∞	.....	.....	.....

Opal. = On ne note pas d'apparition nette de trouble au cours de la dilution; après addition de 30 cm³ d'eau, le milieu est opalescent.

∞ = Solubilisation complète.

Les quatre tweens 20, 40, 60 et 80 réalisent la solubilisation du tétrachlorure de carbone, mais se montrent d'une activité inégale. La solubilisation apparaît d'autant plus facile (et nécessite des quantités moindres d'agent actif), que la chaîne grasse du tween comporte un plus grand nombre de chaînons

TABLEAU XX

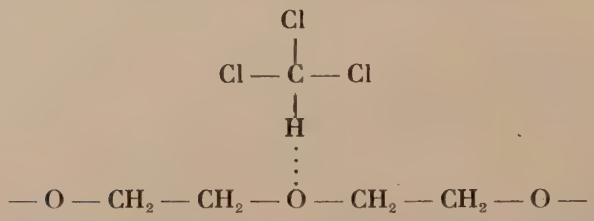
Solubilisation du chloroforme par les tweens 20, 40, 60 et 80 en milieu hydrométhanolique (t = 20° c).

Quantité de tween (q *mg*)	Indice de dilution aqueuse selon l'agent solubilisant employé			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	5,5	5,5	5,5	5,5
20	.....	.....	.....	2
40	3	2	.....	1,5
80	2,5	.....	.....	1,5
100	.....	1,5	1	1,5
120	2	.....	.....	.....
160	2	.....	.....	.....
200	2	1,5	.....	.....
300	.....	.....	1	1,5
400	2	3	3	1
500	.....	3,5	3,5	3
600	2	3,5	4	3,5
700	.....	.....	.....	4
800	3	.....	4,5	4
900	.....	4,5	4,5	4
1.000	4	.....	.....	.....
1.200	4,5	.....	.....	.....
1.800	5,5	.....	.....	.....

méthyléniques. Cette constatation nous incite à penser que la dispersion en phase aqueuse transparente du dérivé tétrahalogéné s'effectue par pénétration dans la partie profonde, lipidique, des micelles de tween. Nous remarquons, en outre, que l'indice de dilution aqueuse du tétrachlorure de carbone ne s'abaisse que faiblement lorsqu'on introduit le tween dans la solution méthanolique et même, dans le cas du tween 20, qu'il ne prend jamais de valeur inférieure à celle du témoin.

Avec le tétrachlorure de carbone et le chloroforme, nous

retrouvons un nouvel exemple de deux substances, l'une pratiquement insoluble dans l'eau, l'autre faiblement soluble (1 p. 100 environ), dont la solubilisation aqueuse par un agent polyoxyéthylénique apparaît plus aisément réalisable pour le composé non hydrosoluble. En effet, nous n'avons pas réussi à entraîner en phase aqueuse le chloroforme par les tweens et, de plus, la baisse correspondante de l'indice de dilution aqueuse traduit l'existence d'associations moléculaires peu solubles, où le chloroforme doit s'unir aux atomes d'oxygène des chaînes hydrophiles du tween par une liaison hydrogène.



Ici encore, comme pour la solubilisation en milieu hydrométhanolique du menthol et du thymol (voir pp. 57 et 64), lorsque la concentration en tween dépasse la valeur correspondant au minimum de la courbe, un louche s'observe au début de la dilution aqueuse et disparaît dès qu'on poursuit l'addition d'eau. Nous l'avons représenté par une zone hachurée sur la figure 11.

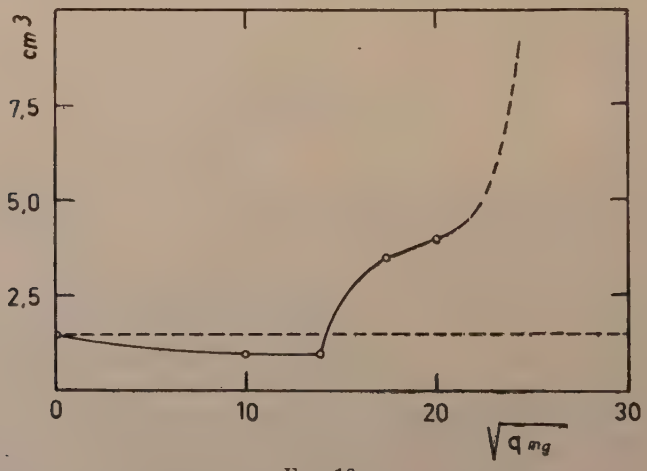


Fig. 10.

Indice de dilution aqueuse du tétrachlorure de carbone en présence de tween 60. (Milieu hydrométhanolique.)

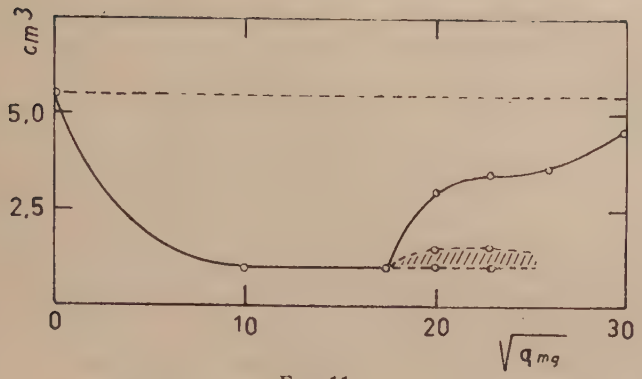


Fig. 11.

Indice de dilution aqueuse du chloroforme en présence de tween 60. (Milieu hydrométhanolique.)

Nous avons examiné, toujours avec le même protocole opératoire, la solubilisation en milieu hydroalcoolique du bromoforme. Ce dérivé halogéné, beaucoup moins soluble dans l'eau que le chloroforme, donne lieu également à une baisse de l'indice de dilution aqueuse, mais moins prononcée. Ces associations moléculaires par liaison hydrogène se font donc moins facilement avec les composés bromés qu'avec les composés chlorés, comme l'avait déjà noté Glasstone [74].

Nous n'avons pu étudier la solubilisation hydroalcoolique de l'iodoforme, à cause de la solubilité insuffisante de ce produit dans l'éthanol ou le méthanol.

Solubilisation comparée de composés à chaîne linéaire

Dans le but de préciser l'influence de la constitution chimique du composé non hydrosoluble sur sa solubilisation par les tweens, nous avons mesuré les valeurs de l'indice de dilution aqueuse de cinq substances possédant toutes une chaîne de huit carbones :

— L'alcool *n*-octylique, alcool primaire;
— Le méthyl-*n*-hexylcarbinol, alcool octylique secondaire (octanol-2);
— L'acide caprylique;
— Le bromo-2-octane;
— L'octane normal.

Nous avons pu adopter un protocole d'expérience commun pour ces cinq substances :

Solution éthanolique 0,3 M du composé ..... 2 cm³.
Alcool éthylique à 97° ..... 4 cm³.

1° *Solubilisation hydroéthanolique de l'alcool* n-*octylique.*

TABLEAU XXI

SOLUBILISATION DE L'ALCOOL *n*-OCTYLIQUE PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	11	11	11	11
2,5	.....	11	11	11
5	11	10	.....	10
10	.....	.....	10	9,5
15	.....	10	.....	.....
20	9,5	10,5	10	9,5
50	10	11	11	10
100	11	12,5	12	11,5
150	12,5	(15-19) ∞	(16-17,5) ∞	(13,5-17,5) Opal.
160	(12,5-27) ∞	.....	.....	∞
170	(13 -24) ∞	.....	.....	.....
180	(13,5-22) ∞	.....	.....	.....
190	(14 -20) ∞	.....	.....	.....
200	(15 -19) ∞	.....	.....	.....
210	∞	.....	.....	.....

(15-19) = Domaine d'existence du trouble.
Opal. = Opalescent pour 30 cm³ d'eau.
∞ = Solubilisation complète pour 30 cm³ d'eau.

Nous remarquons la solubilisation facile de l'alcool *n*-octylique qui s'effectue pour un rapport limite $R = \frac{78}{160} = 0,48$.

L'addition de petites quantités de tween n'abaisse que faiblement l'indice de dilution aqueuse. L'importance des associations moléculaires où la liaison hydrogène bloque les fonctions hydrophiles des deux composés semble donc être très réduite. Nous remarquons un phénomène que nous n'avons pas constaté jusqu'ici : lorsque la quantité de tween est voisine de la quantité nécessaire à la solubilisation complète (A, fig. 12), l'addition d'eau amène un louche (B) qui dispa-

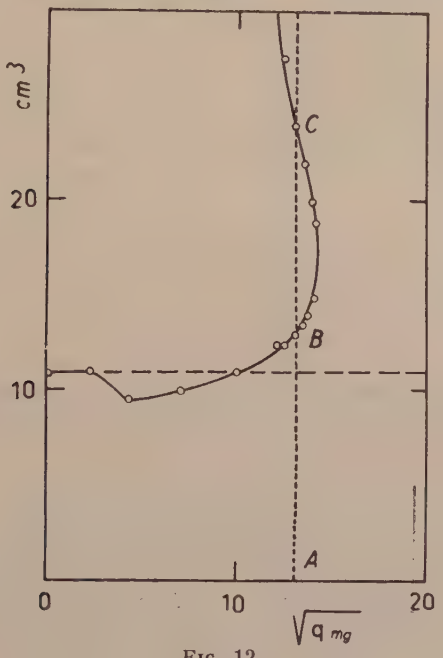


Fig. 12.

Indice de dilution aqueuse de l'alcool *n*-octylique en présence de tween 20. (Milieu hydroéthanolique.)

raît (en C) pour une dilution ultérieure. Ce phénomène apparaît très différent de celui signalé à plusieurs reprises au cours de la solubilisation en présence d'alcool méthylique. Dans le cas présent, le trouble ne se produit que pour une dilution assez importante (titre en alcool voisin de 30°). Lorsque le trouble a disparu par addition d'un volume d'eau complémentaire, le milieu reste limpide quand on poursuit la dilution. Nous avons consigné dans le tableau XXI les limites d'existence

du louche par des chiffres placés entre parenthèses. Dans certaines limites de concentration en agent actif, le pouvoir solubilisant du tween augmente donc lorsque le titre en alcool baisse. C'est probablement parce que les micelles dont dépend au moins partiellement le pouvoir solubilisant, s'organisent moins facilement en présence d'alcool. La concentration critique de formation micellaire augmente d'ailleurs par addition d'alcool au milieu; en solution alcoolique, les substances superficiellement actives ne forment pas de micelles mais se dispersent moléculairement [105]. On peut admettre également qu'avec l'augmentation de la concentration en eau dans le milieu, un plus grand nombre de groupements oxyéthyléniques du tween contractent des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau de préférence aux molécules de l'alcool non hydrosoluble (ici, *n*-octanol) ou de l'alcool solvant (ici, alcool éthylique).

2° *Solubilisation hydroéthanolique du méthyl-*n*-hexylcarbinol.*

TABLEAU XXII

SOLUBILISATION DU MÉTHYL-*n*-HEXYLCARBINOL PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	13	13	13	13
2,5	12,5	13	13	12
5	12,5	.....	12,5	11,5
7,5	.....	12,5	.....	.....
20	12,5	12	12	11
50	12	13	12,5	12
100	13,5	(16-30) ∞	(15-28) Opal.	(15-25,5) ∞
150	(16,5-26) ∞	∞	∞	∞
200	∞	.....	.....	.....

(15-28) = Domaine d'existence du trouble.
Opal. = Opalescent pour 30 cm³ d'eau.
∞ = Solubilisation complète pour 30 cm³ d'eau.

Le changement de position du groupement alcoolique de l'octanol du carbone terminal au carbone 2 facilite sa solubilisation par le tween.

3° *Solubilisation hydroéthanolique de l'acide* n-*caprylique.*

TABLEAU XXIII

SOLUBILISATION DE L'ACIDE *n*-CAPRYLIQUE PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	12	12	12	12
50	7,5	10	10	9
100	9	12	11	10
150	10	12	12	11
200	11	(14-26) Opal.	(14-24) Opal.	13
250	.....	∞	∞	∞
300	15	.....	.....	.....
350	∞	.....	.....	.....

(14-26) = Domaine d'existence du trouble.
Opal. = Opalescent pour 30 cm³ d'eau.
∞ = Solubilisation complète pour 30 cm³ d'eau.

L'acide *n*-caprylique nécessite, pour être solubilisé, une quantité de tween bien plus importante que l'alcool octylique qui possède une chaîne carbonée de même longueur. Le groupement carboxylique se lie donc avec plus de facilité aux groupements — CH_2 — CH_2 — O — des différents tweens, comme le montre d'ailleurs la baisse assez sensible de l'indice de dilution aqueuse que l'on observe avec cet acide.

Cette constatation permet de comprendre pourquoi nous n'avons pu obtenir précédemment, par la technique directe (voir p. 48), la solubilisation par les tweens de deux acides (acide sébacique, acide phloïonique).

Elle explique également la meilleure solubilisation de l'oléate d'éthyle par rapport à celle de l'acide oléique.

4° *Solubilisation hydroéthanolique du bromo-2-octane.*

TABLEAU XXIV

SOLUBILISATION DU BROMO-2-OCTANE PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOLUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	2,5	2,5	2,5	2,5
20	.....	.....	3	.....
50	3	3	3	3
100	.....	3	3	3
150	.....	3	3	3
200	3	3	5	4,5
250	.....	5	7,5	5,5
300	.....	5,5	18,5	6,5
350	.....	8	21	28
400	3	24	27	Opal.

Opal. = Opalescent pour 30 cm^3 d'eau.

Le bromooctane possède encore sur le carbone voisin d'une extrémité de sa molécule, une fonction polaire. Ce composé est très peu soluble dans l'eau et son indice de dilution aqueuse est faible.

Nous n'avons pas pu réaliser, dans les limites de nos essais, l'entraînement dans l'eau du bromooctane sous forme d'une pseudo-solution transparente. Néanmoins, avec les tweens 40, 60 et 80 on observe que l'indice de dilution croît nettement avec l'augmentation de la quantité d'agent actif mise en jeu. Remarquons que cet indice de dilution aqueuse ne prend jamais de valeur inférieure à celle du témoin, ce qui ne saurait nous étonner puisque ce composé n'a pas de possibilité de s'unir avec les chaînes polyoxyéthyléniques des tweens pour donner des associations moléculaires moins solubles.

5° *Solubilisation hydroéthanolique de l'octane normal.*

TABLEAU XXV

SOLUBILISATION DU *n*-OCTANE PAR LES TWEENS 20, 40, 60 ET 80 EN MILIEU HYDROÉTHANOLIQUE (T = 20° C).

QUANTITÉ DE TWEEN (q *mg*)	INDICE DE DILUTION AQUEUSE SELON L'AGENT SOUBILISANT EMPLOYÉ			
	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
0	2,5	2,5	2,5	2,5
20	.....	2,5	2,5	.....
50	3	3	2,5	2,5
100	.....	.....	3	.....
150	.....	.....	3	.....
200	3	3,5	3,5	2,5
250	.....	.....	4	.....
300	.....	3,5	5	2,5
350	.....	4	6	2,5
400	3	4,5	12,5	2,5

L'octane normal ne possède aucun groupe hydrophile. Ses carbones sont unis par des liaisons de covalence pure et les hydrogènes qui leur sont rattachés ne peuvent contracter aucune liaison hydrogène. La solubilisation s'effectuera uniquement grâce à des forces de VAN DER WAALS entre les chaînes polyméthyléniques des acides gras des tweens et les chaînes homologues de l'octane.

Aussi, les associations moléculaires formées avec les tweens ne seront-elles jamais moins solubles que le carbure lui-même. D'autre part, la solubilisation sera régie par l'importance des chaînes grasses des agents actifs.

Nous n'avons pas pu observer une solubilisation complète, mais les valeurs de l'indice de dilution aqueuse nous semblent très démonstratives : elles augmentent régulièrement du tween 20, à chaîne laurique, au tween 40 (ester palmitique), puis au tween 60 (ester stéarique). Le comportement particulier du tween 80, homologue oléique, doit être en rapport avec

la configuration *cis-* de l'acide oléique qui gêne le rapprochement des chaînes carbonées de l'octane et de l'acide gras éthénique. Rappelons également que Langmuir [106], étudiant le comportement des films monomoléculaires d'acides gras non saturés, a été amené à considérer la double liaison comme un centre hydrophile secondaire.

C. — Conclusions. Le pouvoir solubilisant des tweens.

Nous avons étudié le pouvoir solubilisant des tweens en mettant en jeu deux techniques différentes :

— La technique directe, où l'on examine le comportement en phase aqueuse de solutions de composés insolubles dans les différents tweens;

— La technique de l'indice de dilution aqueuse, où l'on observe l'aspect d'une solution alcoolique du tween et de la substance non soluble à laquelle on ajoute des quantités croissantes d'eau distillée.

La deuxième technique nous est apparue plus nuancée que la première : elle permet en particulier de s'apercevoir que certaines associations moléculaires entre le tween et diverses substances insolubles sont moins solubles en milieu hydro-alcoolique que la substance même dont on veut étudier la solubilisation.

Certains aspects de la solubilisation par les tweens se retrouvent avec les autres substances superficiellement actives ionisées (savons ordinaires, savons invertis, etc.).

1° Pour une proportion convenable d'agent actif par rapport à la substance insoluble, on obtient des dispersions aqueuses transparentes et stables d'où la substance solubilisée est difficilement extractible par les solvants habituels.

2° La solubilisation des substances apolaires est difficile, surtout pour les carbures aliphatiques. Elle nécessite une très forte proportion d'agent actif. Elle n'aboutit parfois qu'à des suspensions instables. La substance apolaire doit s'intercaler entre les feuillets lipidiques des micelles des agents actifs; aussi la solubilisation s'avère-t-elle facilitée lorsqu'on emploie des détergents possédant une longue chaîne carbonée (tween 40, tween 60).

3° La présence d'un groupement hydrophile dans la substance insoluble, permet son orientation à l'intérieur de la micelle de l'agent actif qui devient ainsi une micelle mixte et facilite la solubilisation.

4° Dans une série homologue, une substance est d'autant plus aisément solubilisée que son poids moléculaire est plus faible, sans qu'on puisse toutefois noter de proportionnalité directe entre la longueur de la chaîne aliphatique d'un alcool, par exemple, et son aptitude à la solubilisation.

5° Le pouvoir solubilisant des tweens apparaît nettement influencé par la température, mais — comme pour les agents actifs ionisés [222] — il est difficile d'établir une loi générale. Cependant, dans un grand nombre de cas, le pouvoir solubilisant est maximum pour une température voisine de la température ambiante et diminue aussi bien par chauffage à 40° C que par séjour des solutions à la chambre froide. Le point de fusion du tween, comme celui de la substance solubilisée, sont également à prendre en considération.

Certaines particularités de la solubilisation par les tweens, au contraire, semblent spécifiques et dépendent de la nature chimique du groupement hydrophile de ces agents. L'hydrophilie des tweens provient de la fixation, au niveau des atomes d'oxygène de leurs groupements oxyéthyléniques, de molécules d'eau retenues par des ponts hydrogène. Lorsqu'un composé insoluble possède une fonction hydrophile susceptible de donner de telles liaisons, il se fixe sur les groupements oxyéthyléniques de l'agent solubilisant; il en résulte à la fois, pour la substance à solubiliser, la dissimulation de sa fonction hydrophile, et pour le groupement oxyéthylénique intéressé du tween, l'impossibilité de s'hydrater : d'où la formation d'associations moléculaires peu solubles, parfois même moins solubles que le composé initial. Ainsi s'explique le fait que la solubilisation du thymol, du chloroforme ou de l'acide oléique, par exemple, substances respectivement plus hydrophiles que le menthol, le tétrachlorure de carbone et l'oléate d'éthyle, nécessite une quantité de tween plus grande que celle nécessaire pour entraîner en phase aqueuse ces trois derniers composés.

D'autre part, la présence d'alcool éthylique ou méthylique, qui inhibent fortement le pouvoir solubilisant des substances actives ionisées, facilite au contraire la solubilisation par les tweens. Les sels minéraux, en faible concentration correspondant à l'isotonie des solutions, se montrent dépourvus de toute action.

II. — FORMATION DE FIGURES MYÉLINIQUES

De nombreuses substances peuvent être entièrement dispersées en phase aqueuse où elles donnent des solutions moléculaires : il en est ainsi pour tous les composés organiques dont les molécules ne possèdent que des groupements hydrophiles, comme par exemple les oses, l'urée, etc. Au contraire, des composés dépourvus de toute fonction polaire, comme les carbures aliphatiques ou aromatiques, ne possèdent pratiquement aucune solubilité dans l'eau.

Entre ces deux classes extrêmes se situe une gamme assez étendue d'intermédiaires qui correspondent au groupe des composés « amphiphiles » ou « amphipathiques » et qui comportent dans leurs molécules à la fois des groupements hydrophiles et des groupements hydrophobes. Leur comportement vis-à-vis de l'eau sera en relation directe avec le nombre et la nature des deux types de groupements. En présence d'une phase aqueuse, en effet, les molécules de ces substances seront soumises à des influences différentes : forces d'affinité pour le solvant des groupements hydrophiles, tendant à entraîner la dispersion; forces de cohésion (représentées en particulier par les forces de Van der Waals) s'opposant à la dispersion en maintenant rapprochées les parties lipidiques des molécules [53]. Pour les savons alcalins ordinaires ou les tweens 20, 40, 60 et 80, l'affinité pour l'eau l'emporte : ces substances sont hydrosolubles; les forces de cohésion manifestent cependant leur présence par la formation de micelles dans lesquelles les chaînes grasses polyméthyléniques sont jointives. A l'opposé, le cholestérol, par exemple, n'est pratiquement pas soluble dans l'eau : son oxhydrile hydrophile lui permet cependant de former des suspensions assez stables.

Certains composés amphipathiques enfin, dont les lécithines constituent le prototype, mis au contact de l'eau, vont manifester un comportement particulier : leurs groupements hydrophiles s'hydratent énergiquement, mais la cohésion des parties grasses étant trop prononcée, elles ne peuvent cependant se disperser dans la phase aqueuse. On observera uniquement le gonflement de la substance en présence d'eau, gonflement qui traduit la pénétration des molécules d'eau dans la masse du composé.

L'aspect microscopique du gonflement de la lécithine est bien connu depuis les observations de Virchow [218] : un fragment de ce lipide phosphoré, mis au contact d'une goutte d'eau entre lame et lamelle, ne tarde pas à se hérisser, au niveau de sa région périphérique, d'excroissances cylindriques, centrifuges, fluides, qui s'allongent progressivement tout en s'enchevêtrant mutuellement. Par leurs aspects morphologiques minutieusement décrits par Nageotte [147], ces tubes se rapprochent des gaines médullaires des fibres nerveuses, d'où leur nom de figures myéliniques. Les tubes myéliniques représentent un mode particulier de structure dont l'organisation est déclenchée par l'eau. Ce solvant oriente les molécules de lécithine qui forment des lames d'épaisseur bimoléculaire dont l'empilement constitue le substratum de la paroi des tubes. Ces derniers présentent, en effet, une structure feuilletée [147], comme le confirment les expériences de micromanipulation [23]. Les molécules de lécithine sont orientées de telle sorte que leur axe se trouve perpendiculaire à celui du tube myélinique. La figure myélinique apparaît donc comme un cristal liquide, fluide selon l'axe du tube, solide dans la direction perpendiculaire. C'est une des formes de l'état smectique de la matière.

Des figures myéliniques peuvent être également obtenues en associant deux substances : l'une hydrosoluble et l'autre insoluble dans l'eau, à la condition qu'elles présentent une certaine correspondance de structure, permettant une « syncristallisation » au sens le plus large du mot [47]. Les règles générales permettant de prévoir et d'interpréter la formation de ces associations moléculaires ont été proposées par Dervichian et Magnant [53, 136].

La gamme des substances superficiellement actives non ionisées, dérivées de l'anhydride de sorbitol, comprend de nombreux représentants possédant chacun une valeur différente de la balance hydrophile-lipophile. Nous avons étudié le mode de gonflement par l'eau de plusieurs représentants, soit seuls, soit en association.

A. — Gonflement des esters gras d'anhydrosorbitol *(spans)*

Nous avons examiné le comportement vis-à-vis de l'eau des spans 20, 80 et 85 qui sont respectivement les monolaurate, monooléate et trioléate d'anhydride de sorbitol. Notre technique d'examen est la suivante : sur une lame parfaitement dégrais-

sée à l'alcool et bien sèche, on dépose une petite gouttelette (*) du produit à examiner. On la recouvre d'une lamelle qui, reposant en outre sur trois ou quatre petits fragments de lamelle brisée, se trouve ainsi maintenue à faible distance de la lame. La gouttelette prend donc la forme d'un cylindre aplati. Avec une pipette effilée, on dépose ensuite, le long du bord de la lamelle, une goutte d'eau distillée qui, par capillarité, arrive rapidement au contact du produit. On observe alors au microscope l'aspect du gonflement.

Le span 85 ne donne lieu à aucune figure de gonflement. L'interface entre le composé et l'eau reste absolument linéaire. On obtient une image identique à celle formée par un globule d'huile de paraffine dans l'eau. La gouttelette du trioléate, examinée entre nicols croisés, demeure isotrope en présence d'eau. Tardivement, on observe cependant dans la gouttelette, au voisinage de l'interface, l'apparition d'une fine vacuolisation.

Avec les spans 20 et 80, on observe un léger gonflement qui ne donne cependant pas lieu à formation de figures myéliniques. L'interface fournit de grosses masses bourgeonnantes qui se dirigent lentement vers la phase aqueuse. Dans la masse du span apparaît, en arrière de l'interface, une zone fortement birétringente qui traduit l'orientation des molécules sous l'influence de l'eau. On note également l'apparition de nombreuses vacuoles.

Le mélange préalable aux spans 20 ou 80 de tweens complètement hydrosolubles (tweens 20, 40, 60 ou 80) permet l'observation de magnifiques figures myéliniques et ceci pour une large gamme de proportions relatives des deux constituants (de 3/1 à 1/3 environ, selon les tweens). Les tweens 20, 40, 60 ou 80 ne fournissent par eux-mêmes, bien entendu, aucune image de gonflement puisqu'ils sont entièrement dispersibles dans l'eau; ils forment facilement des associations moléculaires avec les spans, puisque les deux types de substances possèdent en commun le même élément de structure : le cycle de l'anhydride de sorbitol et la chaîne grasse. L'hydrophilie des associations moléculaires se situe entre celles des éléments constitutifs.

(*) Ou un fragment s'il s'agit d'une substance ou d'un mélange solide.

B. — Gonflement des tweens non hydrosolubles

Les tweens 21, 81 et 85 sont des dérivés polyoxyéthyléniques de monolaurate, monooléate et trioléate d'anhydride de sorbitol. Pour ces trois composés, l'oxyéthylation n'a pas été poussée jusqu'à l'obtention de dérivés hydrosolubles. Ces trois composés, liquides à la température du laboratoire, fournissent des figures myéliniques très typiques (fig. 13). Le gonfle-

Fig. 13.

Figures myéliniques obtenues au cours du gonflement du tween 21.

ment de ces trois tweens est nettement influencé par la température. Nous avons remarqué que, pour une température inférieure à + 16° C, les tubes n'apparaissent que très tardivement : les premières phases du gonflement consistent alors en la formation de gros renflements à contours arrondis qui donneront ultérieurement naissance aux figures myéliniques. De plus, les figures myéliniques fournies par le tween 85 sont souvent granuleuses.

Tandis que la périphérie de la gouttelette s'entoure d'une couronne de filaments que l'on voit flotter dans la phase aqueuse, on note également de nombreuses modifications à l'intérieur de la gouttelette elle-même, correspondant à celles décrites par Nageotte [147] au cours de l'hydratation de l'extrait alcoolique de cerveau : les structures stratifiées, pour les tweens, sont surtout représentées par des bâtonnets à moulures de révolution de Friedel [70] (fig. 14). Remarquons que les bâtonnets de Friedel apparaissent ici par gonflement en présence d'eau, alors qu'ils ne s'observent dans le disque

central des préparations d'extrait de cerveau qu'en présence d'alcool à 85°. Ces bâtonnets correspondent également à des associations moléculaires réalisées sous l'influence de l'eau qui

Fig. 14.

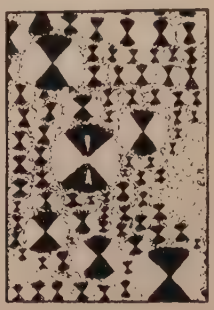


Fig. 15.

Fig. 16.

Fig. 14. — Bâtonnet à moulure de révolution de Friedel obtenu au cours du gonflement du tween 81 (lumière polarisée).

Fig. 15. — Pseudocônes observés dans la zone centrale d'une préparation de tween 81 au contact de l'eau (lumière polarisée).

Fig. 16. — Figures en chenille observées dans la zone centrale d'une préparation de tween 81 au contact de l'eau (lumière polarisée).

oriente les molécules dans le sens de la longueur du bâtonnet, comme en témoignent les couleurs d'addition qu'ils donnent en lumière polarisée quand on leur superpose une lame de gypse dont l'axe est parallèle à leur longueur.

Nous avons également remarqué, au centre de nos préparations, des filaments anisotropes et des structures radiées, « pseudo-cônes » (fig. 15) ou « figures en chenilles » (fig. 16).

Nous n'insisterons pas davantage sur la description et l'interprétation de ces différents aspects (*). Notons simplement que les associations moléculaires qui se produisent à l'intérieur des préparations possèdent une surface hydrophobe différente de la surface hydrophile des filaments myéliniques. Dans les films bimoléculaires, les molécules présentent donc une orientation opposée dans les deux cas. On note d'ailleurs, au fur et à mesure que l'eau pénètre à l'intérieur de la gouttelette, la disparition progressive des structures à surface hydrophobe.

Dervichian et Magnant [55] ont examiné la fixation des

(*) Voir [147, 136].

colorants par les figures myéliniques. Nous avons repris cette étude dans le cas particulier des figures de gonflement des tweens 81 et 85, en remplaçant dans notre mode opératoire l'eau distillée par une solution à 1 p. 1.000 de divers colorants, acides ou basiques. Nos résultats sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU XXVI

COLORATION DES FIGURES MYÉLINIQUES OBTENUES AVEC LES TWEENS 81 ET 85.

	COLORANTS	TWEEN 81	TWEEN 85
Colorants acides	Bleu trypan	±	+
	Acide picrique	±	+
	Eosine	±	+
	Fuchsine acide	0	0
	Bleu à l'eau	0	0
	Vert sulfo	0	0
	Erythrosine	+	+
	Vert lumière	±	0
Colorants basiques	Bleu de méthylène	+++	+++
	Thionine	+++	+++
	Violet hexaméthylénique	++++	++++
	Fuchsine basique	+++	+++
	Safranine	+++	+++

0 : pas de coloration.
± : coloration douteuse.
+ : coloration légère.
+++ : coloration forte.
++++ : coloration intense.

Il existe une différence frappante entre la fixation des colorants acides et celle des colorants basiques. On pourrait penser que ce fait provient de la présence dans les tweens de petites quantités d'acides gras libres. Cette explication ne paraît pas valable, car nous avons effectué de nouvelles expériences avec des tweens dont tout l'acide gras libre avait été extrait en

mettant en jeu la technique de Davis [40] : les résultats ont été identiques. On peut supposer alors que la faible charge existant au niveau des atomes d'oxygène des groupements oxyéthyléniques est suffisante pour attirer à leur contact les molécules des colorants possédant une charge opposée. Au cours de ces essais, nous n'avons jamais observé d'inhibition du gonflement par les colorants étudiés.

La substitution à l'eau distillée de solutions aqueuses tamponnées, dans la gamme de *p*H : 3 - 8,5 s'est montrée sans influence sur la production de tubes myéliniques par les tweens non hydrosolubles.

En présence de solutions hydroalcooliques, la formation des figures myéliniques persiste tant que le titre en alcool est inférieur à 25°; pour des titres supérieurs, on remarque que les filaments sont remplacés par des formes de gonflement globu-

TABLEAU XXVII

Concentrations limites des solutions aqueuses de polyoxyéthylène-glycols et de méthoxypolyoxyéthylène-glycols permettant l'observation des figures myéliniques a partir des tweens 21, 81 et 85.

Nature du composé	Poids moléculaire	Concentration limite (g p. 100) de la solution aqueuse pour les		
		Tween 21	Tween 81	Tween 85
Polyoxyéthylène-glycols.	200	50	30	40
	300	40	20	40
	400	40	20	30
	600	40	20	30
	1.000	15	10	10
	1.540	5	< 10	10
	4.000	4	8	12
	6.000	< 4	< 4	< 4
	10.000	2	2	2
Méthoxypoly-oxyéthylène-glycols.	350	40	20	30
	550	40	20	30
	750	15	10	20

leuses. C'est également ce que l'on observe avec des solutions aqueuses de divers polyoxyéthylèneglycols, substances présentant la même constitution chimique que les chaînes hydrophiles des tweens; la concentration suffisante pour empêcher le développement des tubes myéliniques se montre d'autant plus faible que le poids moléculaire de ces glycols est plus élevé (tableau XXVII). A l'intérieur des gouttelettes de ces tweens, on continue cependant à observer une zone biréfringente riche en bâtonnets de FRIEDEL, en pseudo-cônes et en figures en chenille.

C. — GONFLEMENT DES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES TWEENS HYDROSOLUBLES - SUBSTANCES NON HYDROSOLUBLES

Les mélanges de tweens hydrosolubles et de substances insolubles dans l'eau peuvent fournir des dispersions aqueuses transparentes lorsque la proportion d'agent actif est suffisante. Nous en avons vu de nombreux exemples dans les pages précédentes. Lorsqu'au contraire le mélange est riche en composés non hydrosolubles, il se produit en présence d'eau des phénomènes de gonflement que nous avons étudiés dans le cas particulier des associations moléculaires tweens - acides gras et tweens - alcools à chaîne grasse. On réalise des mélanges en proportions variables (*) des tweens 20, 40, 60 et 80 et de divers composés insolubles; comme précédemment, on étudie au microscope les aspects de leur hydratation entre lame et lamelle.

Des figures myéliniques très typiques s'observent avec les alcools octylique, décylique, dodécylique, oléylique et stéarylique, quel que soit le tween employé. Avec l'alcool stéarylique, toutefois, les tubes myéliniques ne se produisent pas à la température ordinaire, mais à 40° C environ. A la température du laboratoire, en effet, la cohésion entre les longues chaînes comportant dix-huit carbones, s'avère trop forte et ne permet que la réalisation d'associations moléculaires solides, décelables seulement par la technique des lames superficielles [186, 51], mais incompatibles avec le caractère fluide des figures myéliniques. Le chauffage diminue la cohésion de l'association moléculaire et permet de ce fait la croissance des tubes. Quand la chaîne de l'alcool possède moins de huit carbones, la cohé-

(*) Correspondant dans la plupart des expériences aux rapports pondéraux 4/1, 1/1, 1/4.

sion est insuffisante et les mélanges alcool heptylique-tweens, mis au contact de l'eau se dispersent en donnant une multitude de gouttelettes sans former de figures myéliniques.

Il est intéressant de comparer nos résultats avec ceux obtenus par DERVICHIAN et MAGNANT qui utilisent comme agents actifs les sels alcalins des acides gras et divers alcoylsulfates. Ces auteurs [53] n'ont observé avec les alcools dodécylique, tétradécylique, cétylique et octadécylique de figures myéliniques qu'avec le seul oléate de sodium, dont la chaîne non rectiligne apporte dans l'association un désordre suffisant pour permettre l'état fluide. La syncristallisation trop prononcée de composés hydrosolubles et non hydrosolubles à chaîne uniquement linéaire entraîne une trop forte cohésion qui s'oppose au gonflement. Avec les tweens, l'existence dans la molécule d'une partie cyclique (anhydride de sorbitol) diminue la cohésion entre les chaînes grasses au profit de l'affinité. Bien que nos résultats soient à première vue différents de ceux de DERVICHIAN et MAGNANT, nous admettrons avec eux que « l'association d'une molécule polycyclique avec une molécule à chaîne droite simple correspond à la condition idéale de formation des figures myéliniques ». Mais, tandis que ces auteurs utilisent comme substances insolubles des molécules polycycliques (cholestérol, stérides...) et comme substances hydrosolubles des molécules linéaires, dans nos propres expériences c'est l'inverse qui est réalisé : nous associons aux alcools gras insolubles à chaîne linéaire des composés hydrosolubles, sinon polycycliques, tout au moins cycliques et dont, en outre, les groupements hydrophiles se trouvent répartis sur une vaste surface.

Ces considérations permettent également d'expliquer pourquoi nous avons obtenu des résultats positifs avec d'autres composés à chaîne linéaire simple, les acides caprylique (C_8), pélargonique (C_9), undécylénique ($C_{11}\,\Delta_{10-11}$), undécylique (C_{11}), laurique (C_{12}), oléique ($C_{18}\,\Delta_{9-10}$), palmitique (C_{16}), margarique (C_{17}) et stéarique (C_{18}) (*). L'introduction de groupements hydrophiles sur la chaîne de l'acide gras diminue la cohésion et entrave la formation de figures myéliniques : l'acide ricinoléique associé aux différents tweens se disperse au contact de l'eau, sous forme d'une multitude de gouttelettes très petites, donnant au microscope l'aspect d'une fumée noire. Avec les acides gras comme avec les alcools à chaîne

(*) Vers 40° C seulement avec les trois dernières substances.

grasse, le raccourcissement de la chaîne carbonée diminue la cohésion : l'heptoïque (C_7) ne donne plus de tubes myéliniques.

Des dérivés polyoxyéthyléniques de l'alcool laurique (Brij 35) et de l'acide stéarique (G 2153) fournissent également, à chaud, des figures myéliniques en présence d'eau.

L'observation des figures myéliniques peut se faire selon deux modalités différentes : soit, comme nous venons de le voir, en réalisant un mélange (*) des deux substances, soluble et insoluble et en étudiant son comportement vis-à-vis de l'eau distillée, soit en mettant une parcelle (ou un cristal) de la substance insoluble en présence d'une solution aqueuse de la substance hydrosoluble. Avec certains couples, oléate de sodium - cholestérol, par exemple, les deux procédés donnent des résultats identiques bien que les filaments myéliniques soient toujours plus abondants lorsqu'on réalise au préalable le mélange des deux substances. Les deux procédés ne peuvent être cependant, d'un point de vue théorique, considérés comme équivalents : dans le cas d'un cristal mis au contact d'une solution aqueuse de l'agent actif, par exemple, la réalisation de l'association moléculaire exige un apport d'énergie suffisant à vaincre l'énergie réticulaire du cristal.

C'est ce que nous avons effectivement remarqué avec les tweens. Des solutions aqueuses, à diverses concentrations, des tweens hydrosolubles, mises au contact de fins cristaux de cholestérol ne parviennent ni à les dissoudre, ni même à provoquer le moindre gonflement, bien que nous sachions que les associations moléculaires tween - cholestérol peuvent exister (voir p. 35). Il en est de même avec des gouttelettes de substances insolubles liquides (alcool octylique, alcool décylique) qui ne font que se fragmenter en présence d'une solution aqueuse de tween, alors que ces mêmes substances, mélangées préalablement à l'agent non ionique, fournissent au contact de l'eau des figures myéliniques typiques. L'adsorption des molécules de tween à la surface des cristaux ou des gouttelettes de produits insolubles s'effectue probablement par formation de ponts hydrogène entre le groupement hydrophile du composé insoluble et les oxygènes des chaînes polyoxyéthyléniques des tweens (voir pp. 54 et 70), donnant ainsi naissance à des associations peu solubles incapables de s'organiser pour former des figures myéliniques.

(*) Par dissolution directe ou par évaporation d'une solution dans un solvant commun.

D. — Conclusions

Les figures myéliniques sont des formes de gonflement présentées par des substances ou des associations moléculaires correspondant à un état intermédiaire entre la solubilité et l'insolubilité dans l'eau, lui-même en rapport avec la balance entre les forces de cohésion et les forces d'affinité pour le solvant.

Les tweens non hydrosolubles 21, 81 et 85 donnent avec l'eau des figures myéliniques typiques, colorables par les colorants basiques, inhibées par l'alcool ou les polyoxyéthylèneglycols.

Les tweens hydrosolubles 20, 40, 60 et 80 possèdent une grande aptitude à donner des filaments myéliniques lorsqu'on met en présence d'eau leurs asociations moléculaires avec de nombreux composés insolubles à structure linéaire. Cette aptitude provient de leur configuration chimique et en particulier de l'existence dans leur molécule d'une partie cyclique qui gêne la cohésion entre les chaînes grasses.

On ne peut observer de figures myéliniques en mettant un composé non hydrosoluble en présence d'une solution aqueuse de tween.

III. — ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES AVEC DES DÉTERGENTS IONISÉS

Nous n'avons jusqu'ici examiné que les associations moléculaires que fournissent les tweens avec les composés non hydrosolubles.

Les tweens sont également capables de fournir des associations moléculaires avec des substances hydrosolubles et tout spécialement avec les substances superficiellement actives ionisées. Nous aurons l'occasion de revenir longuement sur le comportement biologique de ces associations mais, au préalable, nous voudrions signaler trois types d'expériences qui peuvent les mettre facilement en évidence.

A. — Inhibition par les tweens de la formation des figures myéliniques dans le système cholestérol - laurylsulfate de sodium.

Un cristal de cholestérol mis au contact d'une solution aqueuse de laurylsulfate de sodium (*) ne tarde pas à se hérisser au niveau de la périphérie d'une couronne de figures myéliniques qui croissent dans la phase aqueuse. Au bout d'un temps suffisant, tout le cristal peut être ainsi transformé en ces formes de gonflement. Nous avons signalé que, dans les mêmes conditions, le cristal de cholestérol ne subit aucune modification visible au microscope en présence de solutions aqueuses de tweens.

L'action du laurylsulfate peut être complètement entravée par addition de tween à sa solution. Deux expériences démonstratives sont groupées dans le tableau suivant.

TABLEAU XXVIII

Formation de figures myéliniques dans le système cholestérol-laurylsulfate de sodium. Inhibition par les tweens 20 et 80.

Tubes n°	1	2	3	4	5	6
Laurylsulfate à 0,5 p. 100 (en cm³)....	0	1	1	1	1	1
Tween à 10 p. 100 (en cm³)	1	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Eau distillée (en cm³)	1	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
Tween 20	0	+	+	+	0	0
Tween 80	0	+	+	0	0	0

0 = Pas de figures myéliniques.
+ = Figures myéliniques.

B. — Augmentation de la solubilité de certains agents actifs ionisés par les tweens

De nombreux agents actifs ionisés se dissolvent très facilement et à forte concentration dans l'eau chaude; leurs solutions restent stables à la température du laboratoire; ces substances se montrent, au contraire, souvent peu solubles à froid

(*) L'activité de la solution est proportionnelle à la concentration, mais des solutions diluées (0,02 p. 100) donnent encore des figures myéliniques très nettes.

et le séjour en glacière de solutions assez concentrées entraîne rapidement l'apparition d'un précipité cristallin. Il en est ainsi du laurylsulfate de sodium et de nombreux sels d'ammonium quaternaire à chaîne grasse (cétavlon (*), biocidan (**), bradosol (***)).

Nous avons signalé plus haut la stabilité au froid des solutions aqueuses des différents tweens hydrosolubles. Nous avons constaté que l'addition de tween en quantité suffisante augmentait considérablement la solubilité à froid de nombreux agents actifs ionisés. Nous n'avons pas étudié le phénomène d'une manière complète et nous nous contenterons de donner les résultats d'une expérience dans les systèmes tweens-laurylsulfate de sodium (tableau XXIX).

TABLEAU XXIX

COMPORTEMENT, APRÈS VINGT-QUATRE HEURES DE SÉJOUR A + 5° C, DE SOLUTIONS CONTENANT A LA FOIS DU LAURYLSULFATE DE SODIUM ET DIFFÉRENTS TWEENS.

Tubes n°.....		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Laurylsulfate de sodium, solution à 5 p. 100 (en cm³).....		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de tween, 1 cm³ à la concentration g p. 100.....		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Aspect des tubes.	Tween 20.....	P	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	Tween 40.....	P	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	Tween 60.....	P	P	P	P	P	P	P	P	O	O	O
	Tween 80.....	P	P	P	O	O	O	O	O	O	O	O

P = Précipité cristallin.
O = Clair.

(*) Cétavlon = Bromure de cétyltriméthylammonium.
(**) Biocidan = Bromure de N - cétyl - diméthyl - 1 - cyclohexanol - 2 - ammonium.
Ces deux composés nous ont été fournis respectivement par les Laboratoires de l'Imperial Chemical Industries (Pharmaceuticals) Ltd et par les Laboratoires CLIN que nous tenons à remercier ici de leur amabilité.
(***) Voir p. 52.

Notons ici encore la nette diminution du pouvoir solubilisant du tween 60 aux basses températures, en rapport avec la nature stéarique de la chaîne grasse (voir également p. 46).

C. — Inhibition par les tweens de la précipitation mutuelle des substances superficiellement actives anioniques et cationiques.

On a remarqué depuis longtemps que le mélange de deux solutions de substances superficiellement actives ionisées appartenant à deux classes différentes (dérivés anioniques et cationiques) s'accompagne rapidement de l'apparition d'un précipité constitué par un nouveau composé résultant de la neutralisation réciproque des deux premiers. En présence de tween et dans certaines conditions expérimentales, aucun précipité n'apparaît. Dans l'expérience suivante (tableau XXX), nous avons ajouté à un mélange contenant une quantité fixe de laurylsulfate de sodium et des quantités variables de tween 40, une solution contenant une quantité stoechiométrique d'un sel d'ammonium quaternaire à chaîne grasse, le biocidan (*).

TABLEAU XXX

Influence du tween 40 sur la précipitation mutuelle du laurylsulfate de sodium et du biocidan.

Tubes n°	1	2	3	4	5
Solution de tween 40 à 10 p. 100 (en cm³)..	0	0,25	0,50	0,75	1
Eau distillée (en cm³)	1	0,75	0,50	0,25	0
Laurylsulfate de sodium M/100 (en cm³)	1	1	1	1	1
Biocidan M/100 (en cm³)	1	1	1	1	1
Aspect après vingt-quatre heures	P	P	P	O	O

P = Précipité.
O = Clair.

On peut se demander si le tween a empêché la neutralisation des deux agents ionisés ou s'il solubilise simplement le composé insoluble résultant de leur union. Nous penchons pour

(*) Voir p. 52.

cette deuxième hypothèse, car nous avons constaté que la quantité de tween nécessaire pour dissoudre le complexe insoluble formé isolément se montrait, toutes conditions opératoires égales, identique à celle qui empêche la précipitation dans l'expérience ci-dessus.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES TWEENS

Les propriétés physico-chimiques si particulières des substances superficiellement actives non ionisées et tout particulièrement celles des dérivés polyoxyéthyléniques des esters gras de l'anhydrosorbitol ont rapidement attiré la curiosité des biologistes.

Dès 1945, Dubos [57], puis Dubos et Davis [58] étudièrent l'influence de plusieurs produits de ce type sur la croissance du bacille tuberculeux en milieu synthétique. Ces auteurs montrent que les tweens, en favorisant la mouillabilité des cellules microbiennes, permettent d'obtenir une culture dispersée à partir de faibles inoculums, l'agent actif constituant, en outre, pour le germe, une source non toxique d'acides gras. A partir de ces constatations, Dubos et Middlebrook [60] mettent au point un milieu de culture du B. K. renfermant du tween 80, universellement adopté à l'heure actuelle.

Ces premières expériences avaient confirmé l'hydrolyse facile des tweens par les lipases, déjà signalée par Gomori puis par Archibald qui proposèrent ces agents comme substrats pour la détection histologique des lipases tissulaires [75] ou pour leur dosage [8].

Les travaux de Krantz et collaborateurs montrèrent l'absence complète de toute toxicité des dérivés de l'anhydride de sorbitol chez le Rat, le Singe et même chez l'Homme lorsqu'on les introduit en faible quantité, par la voie digestive, incorporés aux aliments (*). La présence de ces puissants agents émulsifiants dans le tube digestif favorise la résorption du cholestérol [95], des graisses et des vitamines liposolubles [92, 94], amenant ainsi une confirmation des théories de Frazer sur le mécanisme de l'absorption intestinale des lipides [69]. La partie polyoxyéthylénique du tween est excrétée par voie rénale [94], tandis que l'acide gras semble utilisé par l'organisme [64]. L'inocuité des tweens explique leur emploi dans l'industrie alimentaire [62].

L'introduction parentérale de solutions aqueuses de tween est bien supportée même par voie intraveineuse lorsque la

(*) Ces travaux, pour la plupart non encore publiés, sont largement résumés dans la brochure « Feeding tests and auxiliary studies on sorbitol, mannitol and four types of non-ionic emulsifiers derived from long chain fat-forming fatty acids » publiée par Atlas Powder C°, Wilmington, Delaware, U. S.

concentration des solutions ne dépasse pas 5 p. 100 [102] chez l'Homme et différents animaux de laboratoire. Chez le Chien, toutefois, ainsi que chez les espèces voisines [103], l'injection intraveineuse de tween 20 provoque une chute prolongée de la pression artérielle, qui semble due à la libération d'histamine ou d'une substance à activité histaminique; on note également une stimulation de la sécrétion gastrique [112] pouvant être inhibée par un antihistaminique de synthèse [81]. Le Chien présente d'ailleurs vis-à-vis du tween 20 une forte allergie cutanée. La toxicité du tween 20 ne se retrouve ni dans le span 20 [141], ni dans des composés uniquement polyoxyéthyléniques, comme les polyoxyéthylène glycols [192, 193]. Elle semble donc en rapport avec la valeur particulière de la balance hydrophile-lipophile de ce composé. L'injection de tween 20 en solutions concentrées (20 p. 100) entraîne chez le Lapin une forte hyperlipémie portant à la fois sur le cholestérol, les phospholipides et les graisses neutres [96], mais inhibe chez cet animal le développement d'une athérosclérose expérimentale [97, 161].

Néanmoins, la toxicité des tweens se montre toujours inférieure à celle des agents actifs ionisés et souvent même à celle d'autres substances actives non ioniques [96, 87]. Aussi les tweens sont employés dans l'industrie pharmaceutique où ils se sont révélés d'excellents véhicules pour un grand nombre de médicaments [199, 39, 212, 117, 219, 198, 221].

Dans un premier chapitre, nous exposerons nos recherches concernant certains aspects de la toxicité des tweens : toxicité sur un animal aquatique (Daphnie), toxicité vis-à-vis de l'embryon de Poulet, pouvoir hémolytique. Après avoir examiné le comportement du Rat blanc en présence de solutions aqueuses des différents tweens et son pouvoir de discrimination, nous décrirons nos expériences concernant l'influence des tweens sur la germination des graines.

Dans le second chapitre, nous étudierons le comportement biologique de quelques associations moléculaires obtenues avec les tweens : associations tweens-colorants liposolubles, associations tweens-substances superficiellement actives ionisées, ainsi que les modalités de l'extraction du cholestérol sérique en présence des tweens.

Nous terminerons, enfin, par une étude particulière du tween 80, homologue oléique, qui active considérablement la tuberculose expérimentale du Cobaye, et par celle de son dérivé iodé.

CHAPITRE PREMIER

TOXICITÉ DES TWEENS

I. — TOXICITÉ DES TWEENS POUR LA DAPHNIE

La toxicité des tweens a jusqu'ici surtout été étudiée vis-à-vis des germes bactériens [143, 182, 219, 191] ou des mammifères [102, 87, 96]. Nous ne possédons, en ce qui concerne les autres groupes, que très peu de renseignements; on a simplement signalé l'inocuité de ces agents pour un protozoaire, *Glaucoma piriformis* [28], et pour les œufs de *Teredo norvegica* [66]. Nous avons étudié l'action toxique des tweens comparativement à celle d'un grand nombre d'autres substances superficiellement actives ionisées vis-à-vis de *Daphnia pulex*, petit crustacé cladocère d'eau douce, d'environ 1,5 à 2 mm de longueur et 1 mm de largeur. La Daphnie se trouve en abondance dans de nombreuses pièces d'eau de la région bordelaise (*). Cet animal a été souvent proposé comme réactif biologique [18], car la transparence de ses valves permet d'en examiner facilement les organes. Il se montre très sensible vis-à-vis de nombreux agents chimiques. On peut étudier facilement, avec la Daphnie, la toxicité de divers liquides humoraux [16, 17] ou même l'action pharmacodynamique de certains médicaments [24, 14]. Plusieurs auteurs l'ont utilisée pour déterminer les concentrations limites compatibles avec la vie en eau douce de divers déchets industriels habituellement évacués dans les rivières [4, 88] : ce petit crustacé se

(*) Et notamment dans les bassins du Jardin Botanique de la Ville de Bordeaux, où nous nous sommes constamment approvisionné.

montre en effet beaucoup plus sensible que les autres animaux aquatiques, les poissons par exemple [5, 6].

A. — Protocole expérimental

Devant l'abondance des daphnies dans les gîtes naturels, nous n'avons pas eu besoin de réaliser un élevage au laboratoire. Nous avons toujours opéré sur des animaux récoltés depuis moins de deux heures. On prélève les daphnies avec une pipette en prenant bien soin de sélectionner des individus de même grosseur; nous avons choisi des femelles dont la chambre incubatrice est libre. On introduit dix daphnies dans un tube de Borrel avec 16 cm^3 d'eau filtrée provenant de leur milieu naturel. On verse alors dans le tube, qui constituera le témoin, 16 cm^3 d'eau distillée et on homogénéise le mélange. Dans ces conditions, les daphnies restent vivantes pendant plus de quarante-huit heures et on observe qu'elles ne cessent de nager, gagnant la surface par à-coups pour se laisser ensuite redescendre au fond du tube, puis repartent à nouveau. On effectue parallèlement des essais analogues en remplaçant les 16 cm^3 d'eau distillée par 16 cm^3 d'une solution dans l'eau distillée de la substance à étudier. Lorsque la substance se révèle toxique, on constate rapidement que les daphnies s'immobilisent. Nous avons noté, en fonction du temps, le nombre de daphnies immobiles au fond du tube. Avec ces conditions expérimentales très simples, nous avons obtenu cependant des résultats bien reproductibles, probablement à cause de la pénétration facile des substances étudiées. Il nous a semblé inutile de recourir aux préparations de l'animal réactif préconisées par Cambar et Haget [25].

Nos expériences ont toujours été réalisées pendant la période chaude, de mai à septembre. A partir du mois d'octobre, la survie des animaux témoins se montre assez irrégulière et rend difficile l'interprétation des résultats. Il est à remarquer que c'est également à cette époque que l'on observe l'apparition de mâles dans la population jusqu'alors uniquement composée de femelles parthénogénétiques.

B. — Résultats

Les tweens hydrosolubles 20, 40, 60 et 80 présentent tous les quatre une légère toxicité pour *Daphnia pulex* (tableau XXXI). Le tween 20 apparaît le plus nocif et ne

TABLEAU XXXI

Toxicité des tweens pour « Daphnia pulex ».

Nature du tween et concentration (g p. 100)		Nombre d'animaux vivants après					
		1 h.	3 h.	5 h.	7 h.	21 h.	31 h.
Tween 20.....	0,31	10	9	7	3	0	0
	0,625	9	6	5	3	0	0
	1,25	9	7	6	3	0	0
	2,5	6 *	6	5	3	1	0
	5,0	4 *	4	1	0	0	0
Tween 40.....	0,31	10	10	10	7	3	3
	0,625	10	9	8	7	4	1
	1,25	10	9	5	3	2	1
	2,5	10	10	9	6	3	1
	5,0	10	8	6 *	6	4	2
Tween 60.....	0,31	10	10	9	9	5	3
	0,625	10	10	9 *	9	5	3
	1,25	10	10	8	6	4	3
	2,5	9	8 *	8	5	4	0
	5,0	10	9	9	7	4	1
Tween 80.....	0,31	10	10	9	9	0	0
	0,625	10	10	8	7	0	0
	1,25	10	10 *	10	6	1	0
	2,5	9 *	9	7 *	7	2	0
	5,0	9 *	9	8	7	3	0

(*) Voir explication dans le texte p. 102.

permet qu'une survie d'une dizaine d'heures au maximum dans la gamme de concentrations 0,31 - 2,5 g p. 100, de quatre heures seulement pour 5 g p. 100. C'est également celui qui modifie le plus la tension superficielle de l'eau distillée (voir p. 17, tableau II). Les tweens 40, 60 et 80, moins toxiques, ont un comportement très analogue; la toxicité du tween 80 se manifeste toutefois un peu plus tardivement. Pour les quatre agents, l'activité augmente avec la concentration des solutions sans qu'on puisse établir de relation bien nette entre les deux facteurs.

En présence d'une concentration de 5 p. 100 en tween 20, on observe une succession de phénomènes très comparables à ceux décrits par Cambar et Haget en présence de venin de Crapaud [24]. Les daphnies commencent tout d'abord par manifester une vive agitation et pendant une dizaine de minutes nagent activement. Puis les mouvements des antennes deviennent moins efficaces et les animaux se rassemblent progressivement au fond du tube où ils reposent sur une de leurs valves. Les animaux paraissent immobiles, mais de temps en temps, l'un d'eux remonte au sein du liquide : il est rare qu'il puisse parcourir les 8 cm qui le séparent de la surface et il ne tarde pas à retomber au fond du tube.

Si l'on examine alors à la loupe binoculaire une daphnie immobilisée au fond du tube de Borrel, on constate que les antennes ne sont plus animées que de faibles mouvements spasmodiques. On remarque également des mouvements de contraction violente du post-abdomen et, surtout, la persistance des battements cardiaques pendant encore une ou deux heures après l'immobilisation complète de l'animal. Dans nos tableaux et sur nos courbes, nous avons indiqué le nombre d'animaux survivants après un temps variable d'observation. Quand le nombre est suivi d'un astérisque, il s'agit d'un nombre qui a dû être corrigé à la suite de l'observation.

Avec les tweens 40 et 60, nous avons constaté qu'au bout de deux à trois heures, le liquide où nagent les daphnies devient légèrement opalescent, surtout dans les tubes correspondant aux plus fortes dilutions de l'agent actif. Nous avons pensé que ce léger trouble provenait de la libération d'acide gras par hydrolyse du tween, l'eau du milieu naturel où vivent les daphnies étant très riche en bactéries de toutes sortes. Il ne nous a cependant pas été possible d'extraire cet acide gras par agitation avec de l'éther, qui ne clarifie pas le liquide.

Nous avons étudié comparativement l'action sur la Daphnie de deux autres agents superficiellement actifs de nature polyoxyéthylénique, le Brij 35 et le G 2153 (tableau XXXII). Le dérivé polyoxyéthylénique de l'alcool laurique présente une

TABLEAU XXXII

Toxicité pour la Daphnie de deux agents actifs non ionisés.

Nature de l'agent actif et concentration en g p. 100		Nombre d'animaux vivants après								
		1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h.	7 h.	21 h.	31 h.
Dérivé polyoxyéthylénique de l'alcool laurique (BRIJ 35)	0,15	10	9	9	9	9	8	5	1	0
	0,30	10	9	8	8	7	6	6	0	0
	0,60	9	9	7	7	6	5	4	0	0
	1,25	9	8	7	7	6	5	3	0	0
	2,50	9	8	7	7	5	0	3	0	0
	5,00	8	5	5	5	3	0	0	0	0
Stéarate de polyoxyéthylène-glycol (G 2153)	0,15	10	10	10	10	10	10	10	3	2
	0,30	10	10	10	10	9	9	9	5	1
	0,60	10	10	10	10	10	10	10	5	0
	1,25	10	9	9	9	9	9	9	4	0
	2,50	10	10	10	10	9	8	7	2	0
	5,00	9	9	9	9	8	7	7	0	0

toxicité assez forte, voisine de celle du tween 20 : remarquons que les deux composés possèdent la même chaîne grasse de douze carbones. Le G 2153, stéarate de polyoxyéthylène-glycol se rapproche des tweens 40, 60 et 80. Il faut signaler qu'au cours de ces dernières expériences, le milieu reste parfaite-

TABLEAU XXXIII

TOXICITÉ DE SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES IONISÉES POUR « DAPHNIA PULEX ».

NATURE DE L'AGENT ACTIF ET CONCENTRATION (g p. 100)		NOMBRE D'ANIMAUX VIVANTS APRÈS													
		Minutes					Heures								
		7	11	15	17	30	1	1½	2	2½	3	4	5	6	24
Lauryl-sulfate de sodium	0,0078	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	0
	0,015	10	10	10	10	10	9	9	6	6	5	4	1	0	.. .
	0,0625	10	10	10	10	10	7	3	2	1	0	....	....	....	....
	0,125	6	4	3	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
	0,6	5	2	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Désogène (*)	0,015	8	6	5	3	1	0	....	....	....	....	....	....	....	....
	0,03	7	4	3	1	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....
	0,0625	1	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
	0,125	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....
Bradosol (**)	0,007	10	10	10	10	10	10	10	9	6	3	0	....	....	....
	0,015	10	10	10	10	10	7	2	0	....	....	....	....	....	...
	0,03	10	10	10	10	10	3	0	....	....	....	....	....	....	....
	0,04	10	10	10	10	10	2	0	....	....	....	....	....	....	....
	0,0625	10	9	9	7	6	1	0	....	....	....	....	....	....	....
	0,078	8	8	7	6	5	1	0	....	....	....	....	....	....	....

(*) Voir p. 105.
(**) Voir p. 52.

ment limpide avec le Brij 35, tandis qu'il devient opalescent en présence de G 2153; ce point confirme l'hypothèse que nous venons de faire plus haut, car dans le G 2153 comme dans les tweens, la chaîne oxyéthylénique hydrophile est unie à la chaîne grasse par une liaison ester, facilement hydrolysable, tandis que l'union s'effectue pour le Brij 35 par une liaison éther-oxyde, non attaquée par les enzymes biologiques.

Les polyoxyéthylène-glycols, dont la structure est si voisine de la partie hydrophile des tweens, se sont révélés assez peu toxiques vis-à-vis de la Daphnie : aux concentrations de 0,62, 1,25 et 2,5 p. 100, nous n'avons observé aucune mortalité en présence de divers composés dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 300 et 10.000.

Il est intéressant de rapprocher des tweens les saponines, substances à activité de surface également non ionisées, mais d'origine naturelle, qui manifestent une toxicité en rapport non point avec la tension superficielle de leurs solutions aqueuses, mais avec leur origine végétale, c'est-à-dire avec leur constitution chimique. Signalons simplement que celles provenant du Lierre, de l'Anémone et de la Nigelle sont dépourvues de toute nocivité pour *Daphnia pulex*, celles du Quillaya et de la Saponaire apparaissent au contraire fortement toxiques [158].

La toxicité des substances superficiellement actives non ionisées apparaît cependant bien minime lorsqu'on la compare avec celle des agents ionisés. Nous avons groupé dans le tableau XXXIII les résultats de nos expériences effectuées sur la Daphnie avec un composé anionique, le laurylsulfate de sodium et deux ammoniums quaternaires à chaîne grasse, le désogène (*) et le bradosol. La toxicité n'est donc pas en rapport avec la tension superficielle de la solution, les valeurs de cette dernière étant sensiblement identiques pour les solutions de tween ou pour celles des composés ioniques.

II. — TOXICITÉ POUR L'EMBRYON DE POULET

Les embryologistes ont étudié depuis longtemps l'influence de diverses substances chimiques sur le développement de l'œuf (**). Ces essais sont particulièrement faciles à réaliser

(*) Méthylsulfate de paraméthylphényl-1 dodécyltriméthylammonium.
(**) On pourra consulter à ce sujet l'ouvrage d'Ancel [3].

lorsque la substance dont on veut examiner les propriétés s'avère soluble dans l'eau et dans les solutions aqueuses. La non solubilité dans l'eau d'un grand nombre de produits, dont l'intérêt biologique apparaît cependant primordial (hormones stéroliques, vitamines liposolubles, carbures cancérigènes, etc.), vient cependant limiter le champ de ces investigations.

Nous avons vu dans les pages précédentes que les tweens permettent d'entraîner en phase aqueuse un grand nombre de substances non hydrosolubles. Leur emploi comme agents solubilisants, pour les besoins de l'embryologie causale et expérimentale, est conditionné par leur toxicité éventuelle et leur action propre sur le jeune organisme.

En collaboration avec R. Stoll, nous avons effectué quelques expériences sur l'embryon de Poulet. En dehors de l'action de la saponine (Ancel [2]), nous n'avons trouvé dans la littérature aucune mention de la toxicité des substances superficiellement actives non ionisées sur ce réactif biologique.

Notre protocole expérimental a été le suivant : on introduit dans une couveuse à 37°5-38° C, des œufs de poule sélectionnés (Leghorn blanc). Le troisième jour de l'incubation, on effectue une ouverture dans la coquille; on dépose à la surface de l'embryon 0,25 cm^3 de la solution de tween et l'on obture l'orifice pratiqué au moyen d'une lamelle de verre lutée à la paraffine, selon la technique d'Ancel et Wolff. On examine chaque jour au travers de la fenêtre l'évolution de l'embryon.

Ici encore, le tween 20 apparaît plus toxique que les autres esters de l'anhydrosorbitol : avec la solution à 10 p. 100 (soit une dose de 25 mg d'agent actif par œuf), nous avons noté dans tous les cas la mort de l'embryon après vingt-quatre heures, donc au quatrième jour d'incubation. Les embryons ne présentaient aucune lésion caractéristique. Les doses plus faibles nous ont donné des résultats plus irréguliers. La solution à 1 p. 100, essayée sur trois œufs, a tué deux embryons au sixième et au septième jour. Le premier, exencéphale, présentait une hémorragie intra-amniotique; le second semblait normal; le troisième, vivant au douzième jour d'incubation, a été sacrifié : il s'agissait d'un embryon mâle, également normal.

Le tween 80, à la dose de 25 mg par œuf, s'est montré également très actif, tuant les cinq embryons sur lesquels portait l'expérience entre le quatrième et le cinquième jour; nous avons constaté encore l'existence de lésions hémorragiques. Dans les mêmes conditions, les tweens 40 et 60 ont

permis, dans un tiers des cas environ, la survie des embryons qui, après sacrifice, n'ont révélé aucune particularité notable. Avec ces trois dernières substances, des quantités inférieures d'agent actif ont donné des résultats assez divergents, difficiles à interpréter en raison du petit nombre de nos essais expérimentaux.

Nous pouvons cependant affirmer que les tweens ne sont pas dénués de toxicité pour l'embryon de Poulet et que, dans nos conditions expérimentales, ils ne sauraient être employés comme substances solubilisatrices « neutres ». Il convient de rapprocher de ces conclusions celles de Morton et collaborateurs [146] qui ont montré qu'ajoutés à un milieu synthétique à des concentrations allant de 0,05 à 0,5 p. 100, les différents tweens se montraient toxiques pour les cultures de cellules mésenchymateuses de l'embryon de Poulet. L'absence de pouvoir tératogène des tweens mérite également d'être notée.

III. — POUVOIR HÉMOLYTIQUE DES TWEENS

Le pouvoir hémolytique des savons ordinaires est bien connu : la lyse des globules rouges se produit également sous l'influence des agents actifs de synthèse, anioniques et surtout cationiques [167]. L'action des substances superficiellement actives non ionisées sur l'hématie est moins bien connue. Krantz a simplement signalé l'action lytique, assez faible d'ailleurs, du tween 20 sur les hématies de Chien, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Nous avons voulu préciser cette action.

A. — Hémolyse « in vivo »

Nous avons injecté à quatre Lapins des solutions de tween 40 et de tween 60, à la concentration de 5 p. 100 dans l'eau physiologique, à la dose de 2 cm^3/kg. L'injection est pratiquée dans la veine marginale de l'oreille; on l'effectue lentement (environ 2 cm^3 par minute). Nous avons ensuite, après quinze, trente, soixante et quatre-vingt-dix minutes, recueilli, à l'autre oreille, du sang sur héparine. Après centrifugation, le plasma présentait sa teinte habituelle ; dans les conditions où nous sommes placé, les deux tweens ne provoquent donc pas d'hémolyse intravasculaire. La répétition de l'injection intraveineuse pendant quatre jours consécutifs nous a conduit aux mêmes conclusions.

Signalons que les animaux ont toujours parfaitement supporté les injections des substances actives, sans présenter même la moindre polypnée.

B. — Hémolyse « in vitro »

Nous avons effectué nos expériences en milieu tamponné isotonique avec des hématies de Cheval ou d'Homme. Le sang est recueilli sur fluorure de sodium, et les hématies, une fois séparées du plasma, sont lavées à trois reprises avec de l'eau physiologique ordinaire, puis mises en suspension dans vingt fois leur volume d'eau physiologique, tamponnée à *p*H = 7 (*). Les substances actives sont également dissoutes dans l'eau physiologique tamponnée. On réalise en double la gamme des tubes suivants :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Solution de tween à 6 g p. 100....	0	0,1	0,3	0,5	1	2	3	4
Eau physiologique tamponnée.....	4	3,9	3,7	3,5	3	2	1	0
Suspension d'hématies à 5 p. 100..	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

et l'on note le pourcentage d'hémolyse après six heures et vingt-quatre heures.

Les différents tweens possèdent un pouvoir hémolytique faible. Le tween 20 apparaît un peu plus actif que les trois autres : l'hémolyse commence à se produire en sa présence, aux plus fortes concentrations, après environ trente minutes pour les hématies humaines et deux heures pour celles de cheval. Dans les mêmes conditions, il faut deux et quatre heures pour noter l'hémolyse avec le tween 80. Les résultats d'une expérience sont groupés dans le graphique de la fig. 17.

Après vingt-quatre heures, l'hémolyse est complète dans les cinq derniers tubes. Les variations du *p*H, dans la région de *p*H 6,5 à *p*H 7,8, ne modifient pas la marche de l'hémolyse.

(*) Obtenue en ajoutant à trois volumes d'eau physiologique, un volume de tampon phosphaté isotonique de Hendry [85] :

PO_4Na_2H = 0,115 M; PO_4NaH_2 = 0,15 M.

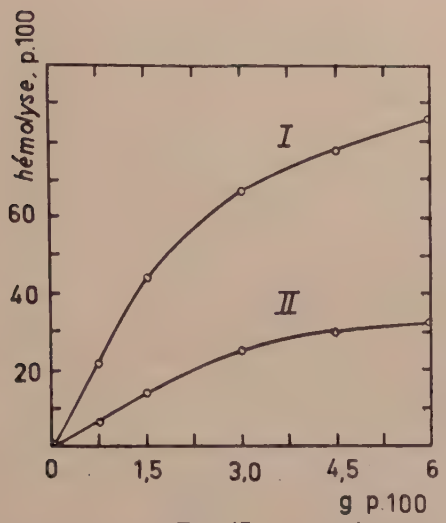


Fig. 17.

Pourcentage d'hémolyse après six heures (hématies humaines; t = 20° C).

I = Tween 20.
II = Tween 80.

Nous avons observé avec tous les tweens, mais plus particulièrement avec le tween 80, que l'hémolyse est précédée d'une modification de la teinte des hématies qui, primitivement rose vermillon, virent au rose violacé.

Les inhibiteurs de l'hémolyse par les agents ionisés freinent également l'hémolyse par les tweens, tout particulièrement le cholestérol. Nous avons étudié comparativement l'activité lytique de solutions des tweens 20 et 80 et de solutions contenant, en plus de la même quantité d'agent actif, des quantités variables de cholestérol « solubilisé ». Dans tous les cas, le cholestérol retarde le début de l'hémolyse, le retard étant grossièrement proportionnel à la quantité de cholestérol présent dans la solution. La présence du stérol retarde également la modification de coloration des hématies que nous venons de signaler. Au contraire, après vingt-quatre heures d'observation, l'influence du cholestérol sur l'hémolyse se montre à peine sensible.

C. — Discussion des résultats

On a émis de nombreuses hypothèses concernant le mécanisme de l'hémolyse par les agents actifs. Le pouvoir lytique n'apparaît pas proportionnel à la tension superficielle ou interfaciale des solutions aqueuses, et ne peut s'expliquer non plus par une adsorption à la surface de l'hématie, la quantité de substance active retenue par un globule rouge, variable d'ailleurs avec le *p*H, étant sans rapport avec ses dimensions superficielles [48]. Il semble plus rationnel d'admettre, avec Dervichian [50], que l'agent actif pénètre dans les associations moléculaires qui constituent sinon la « membrane », du moins la partie périphérique du globule : de nouvelles associations moléculaires se forment ainsi, plus hydrophiles que les précédentes; elles se dissolvent et permettent la libération de l'hémoglobine.

Comment interpréter le faible pouvoir hémolytique des tweens, substances également capables, comme nous l'avons vu, de fournir un grand nombre d'associations moléculaires souvent hydrosolubles ou tout au moins fortement hydrophiles et susceptibles de gonfler en présence d'eau ? On peut rapprocher l'action des tweens sur l'hématie de leur action sur le cholestérol ou sur d'autres substances insolubles : nous avons signalé qu'un cristal de ces substances, mis au contact d'une solution aqueuse de tween, ne subissait aucune lyse ni même le moindre gonflement, tandis que la dissolution directe de la substance hydrosoluble dans le tween fournit un mélange susceptible de donner une dispersion aqueuse transparente. Les tweens ne possèdent donc pas la propriété de former des associations moléculaires avec une substance elle-même déjà engagée dans une association d'un autre type (réseau cristallin ou association lipoprotéique de la membrane du globule), ou tout au moins la réaction :

$$\text{Tween} + (\text{Association moléculaire A-B}) \rightarrow (\text{Association moléculaire tween-A}) + \text{B}$$

ne présente de vitesse appréciable que lorsque l'énergie de liaison dans l'association moléculaire A-B est faible.

On peut se demander si l'hémolyse relativement importante que l'on observe tardivement avec les tweens ne peut s'expliquer par la lente hydrolyse de l'agent actif et la libération d'acide gras, dont les propriétés hémolytiques sont bien

établies. Cette hypothèse ne semble pas devoir être retenue, car le Brij 35, composé non susceptible de s'hydrolyser en solution aqueuse, donne lieu au même type d'hémolyse que les tweens.

Le pouvoir protecteur du cholestérol vis-à-vis de la faible hémolyse causée par les tweens ne traduit que l'immobilisation d'une partie de l'agent actif sous forme de micelles mixtes.

IV. — ACTION SUR LA PERMÉABILITÉ CAPILLAIRE

Nous venons de voir que les tweens, s'ils ne possèdent pas une action hémolytique comparable à celle des agents superficiellement actifs ionisés, modifient cependant lentement la perméabilité de la membrane globulaire, permettant au bout de plusieurs heures l'exsudation de l'hémoglobine. Les expériences que nous allons décrire maintenant montrent que des composés non ionisés sont capables d'agir fortement sur la perméabilité capillaire.

Nous avons utilisé la technique de Menkin [142], qui consiste à injecter à l'animal un colorant colloïdal dans la circulation générale : le colorant s'accumule dans les territoires cutanés où se produit une augmentation de la perméabilité capillaire.

Nous avons opéré sur le Cobaye, en choisissant des animaux à toison claire dont le territoire cutané de l'abdomen et des flancs soit dépourvu de toute tache pigmentaire. On leur rase les flancs deux jours avant l'expérience. Nous avons adopté le protocole suivant : on pratique au niveau de la paroi abdominale quatre injections intradermiques, l'une d'eau physiologique tamponnée à *p*H = 7, la deuxième d'une solution de chlorhydrate d'histamine à 1 p. 10.000, les deux dernières d'une solution à 1 p. 100 de tween dans l'eau physiologique tamponnée. Le volume injecté est chaque fois de 0,20 cm^3. Le siège des injections intradermiques est entouré d'un cercle dessiné à l'encre rouge grasse. Sitôt la dernière injection intradermique terminée, on injecte au Cobaye, par voie intracardiaque, du bleu d'Evans dilué au quart (*), à la dose de 10 cm^3/kg. On observe alors l'apparition éventuelle, au niveau des points d'injection, de taches bleues dont on note le moment d'apparition et l'importance.

(*) Dans quelques expériences, nous avons utilisé une solution de bleu Trypan à 1 p. 100.

Nous avons constaté dans tous les cas l'apparition d'une tache bleue au niveau du lieu d'injection de l'histamine, tandis que le cercle marquant l'emplacement de l'eau physiologique reste incolore. Sur les vingt animaux utilisés, les tweens 20, 60 et 80 ont toujours donné une réaction positive; la tache bleue apparaissait toutefois un peu plus tardivement qu'avec l'histamine, et son intensité était légèrement plus faible. Le comportement des trois tweens expérimentés s'est montré très analogue. Dans les mêmes conditions, on observe également une réponse positive avec le Brij 35. Cette propriété ne semble pas partagée par toutes les substances superficiellement actives : nous n'avons pas observé d'augmentation de la perméabilité capillaire avec le laurylsulfate de sodium (trois animaux), ni avec le bradosol (trois animaux); le désogène (quatre animaux) nous a fourni des résultats inconstants.

Nous avons répété, avec le tween 20, les mêmes expériences chez quatre cobayes qui recevaient au préalable, trente minutes avant les injections intradermiques, 20 mg/kg de N-diméthylaminométhyléthyldibenzoparathiazine (*) par voie intrapéritonéale. En présence de cet antihistaminique de synthèse, les taches bleues apparaissent au niveau des injections d'histamine et de tween 20, mais leur intensité s'est montrée bien plus faible qu'au cours des expériences précédentes. Nous confirmons ainsi les observations réalisées par Bonvallet et Decourt après injection d'histamine chez le Chien préalablement soumis à un antihistaminique. De plus, nos constatations nous incitent à penser que l'action des tweens sur la perméabilité capillaire n'est probablement pas une action directe, mais qu'elle s'effectue avec l'histamine comme intermédiaire.

De nombreuses substances, comme le xylène [179], le chloroforme [1], le bromobenzène [211], etc. appliquées en simple badigeonnage sur la peau de l'animal, provoquent une importante et rapide augmentation de la perméabilité capillaire, décelable par la technique de coloration au bleu d'Evans. Nous avons constaté que, dans ces conditions, les tweens ne manifestaient aucune action. Remarquons d'ailleurs que l'action des substances précitées n'est pas modifiée par les antihistaminiques de synthèse [42].

L'action hypotensive des tweens, décrite par Krantz [102] doit être due, en partie tout au moins, à l'augmentation de la

(*) Phénergan Specia.

perméabilité capillaire qui permet une importante fuite plasmatique.

V. — DISCRIMINATION GUSTATIVE DES DIFFÉRENTS TWEENS PAR LE RAT BLANC

Avant de rapporter les résultats de nos expériences, nous résumerons brièvement les motifs qui nous ont décidé à les entreprendre.

On a voulu, au cours de ces quinze dernières années, élever la préférence alimentaire au rang des mécanismes régulateurs qui assurent la constance du milieu intérieur. L'expérimentation sur le Rat semble avoir apporté maintes confirmations de cette manière de voir [9, 10]. Si l'on présente, en effet, à cet animal, dans des récipients séparés, les divers principes immédiats nécessaires à son alimentation, le Rat se montre capable de prélever qualitativement et quantitativement ces différentes substances de manière à réaliser un régime équilibré approprié à ses besoins actuels. Des « faims spécifiques » peuvent apparaître au cours d'états physiologiques comme la grossesse et la lactation [175] ou de perturbations endocriniennes expérimentales [176, 196]. Cet « instinct alimentaire » apparaît d'ailleurs souvent en défaut [110] et ne saurait probablement être généralisé. Quoi qu'il en soit, l'analyse du comportement alimentaire, sélectif ou non, est rendue difficile par la multiplicité et l'intrication des facteurs qui entrent en jeu : les éléments sensoriels, olfactifs ou gustatifs sont en majeure partie subordonnés aux stimulis d'origine interne qui traduisent les besoins métaboliques [225].

Le comportement de l'animal vis-à-vis de substances non toxiques, non indispensables à sa nutrition et normalement absentes de son alimentation, substances pour lesquelles tout « besoin » semble exclu, doit permettre d'évaluer l'importance des appréciations purement sensorielles. La Souris, par exemple, présente une attirance marquée pour les solutions aqueuses d'alcool éthylique qu'elle préfère à l'eau pure; de plus, elle différencie très nettement l'éthanol du méthanol, dédaignant complètement les solutions de ce dernier alcool (Loiseleur et Petit [117 bis]).

Il nous a semblé intéressant d'étudier le comportement du Rat blanc mis en présence de solutions aqueuses des différents tweens hydrosolubles.

Nous avons déjà signalé leur absence complète de nocivité lorsqu'on les administre au Rat par voie digestive, même si l'on prolonge l'expérimentation pendant plusieurs mois et si la concentration de ces substances atteint 2 p. 100 du poids des aliments ingérés [102]. Au contraire, la présence de ces agents dans le tube digestif facilite la résorption des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles. Les quatre tweens 20, 40, 60 et 80 possèdent une constitution chimique très voisine ne différant que par le nombre de groupements oxyéthyléniques présents dans la molécule et par la nature de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras. Aussi, dans l'organisme, leur destinée est-elle identique : ils sont détruits par hydrolyse de la liaison ester, l'acide gras est métabolisé tandis que la fraction polyoxyéthylénique se retrouve intégralement dans les urines et les fèces. Les solutions aqueuses des quatre tweens hydrosolubles se différencient cependant par leurs caractéristiques physicochimiques.

A. — Technique utilisée

Soixante jeunes rats de souche pure (Wistar), pesant de 100 à 150 g, sont répartis en quatre lots dans quatre cages identiques et soumis pendant toute la durée de l'expérience à une alimentation standard, présentée sous forme de farine à laquelle on ajoute occasionnellement de la verdure, de la viande et du poisson. Dans chaque cage, l'eau nécessaire à la boisson est fournie par quatre biberons identiques, munis d'une tubulure de succion en verre et solidement accrochés aux parois de la cage. On prend bien soin d'assurer un remplissage suffisamment fréquent des biberons, de manière à éviter qu'en aucun moment l'un de ces récipients ne soit entièrement vidé de son contenu. Tous les matins, on mesure à l'éprouvette graduée le volume de liquide restant dans chaque biberon, d'où l'on déduit la quantité d'eau prélevée dans les vingt-quatre heures précédentes. Nous avons tout d'abord déterminé, pour chacune des cages, par tâtonnements successifs, des emplacements de fixation des quatre biberons tels que les prélèvements hydriques soient analogues dans chacun des récipients. Au bout de dix à quinze jours, suivant les cages, les volumes d'eau prélevés dans chaque biberon sont égaux à 10 p. 100 près.

C'est à ce moment que l'on remplace, dans chaque cage, l'eau de deux biberons par une solution aqueuse de tween à

1 p. 100, amenée à pH = 7; ces solutions sont toujours préparées depuis moins de deux jours, afin d'éviter une légère hydrolyse éventuelle de l'agent actif en milieu aqueux. A chaque lot de rats est attribué un tween différent, tween 20, 40, 60 ou 80. La faible tension superficielle des solutions de tweens nous oblige à rétrécir légèrement l'orifice de succion des biberons correspondants, de manière à ce que le liquide ne s'écoule pas spontanément : l'écoulement des liquides, eau ou solution de tween, s'effectue alors pour une aspiration de même intensité. Dans chaque lot, un rat a donc le choix, pour sa boisson, entre deux biberons d'eau et deux biberons de solution de tween. Une permutation irrégulière des quatre biberons est effectuée deux fois par jour en maintenant cependant toujours les récipients aux quatre emplacements préalablement sélectionnés. Chaque jour, pendant dix jours, les volumes d'eau et de solution de produit actif ingérés sont notés, et l'on détermine le rapport

$$A = \frac{\text{volume de la solution de tween ingérée} \times 100}{\text{volume total du liquide ingéré (eau + solution de tween)}}$$

Des valeurs de A voisines de 50 indiqueront que l'animal ne manifeste aucune préférence pour l'eau ou les solutions aqueuses de tween; des valeurs supérieures à 50 seront le témoignage de son attirance par le produit actif; des valeurs inférieures, au contraire, traduiront son aversion.

B. — Résultats obtenus

Nos résultats sont schématisés par les courbes de la fig. 18, qui représentent les variations des valeurs du rapport A pour les tweens 20, 40, 60 et 80, pendant les dix jours de l'expérience [151].

On constate que, dès le premier jour, le Rat différencie très bien le tween 20 de ses trois autres homologues. Son aversion pour l'ester laurique est manifeste; elle se confirmera tout au long de l'expérience : la courbe correspondante se situe constamment à la partie inférieure du graphique et apparaît nettement détachée des trois autres. Remarquons que, parmi les quatre composés étudiés, le twen 20 est le seul à présenter de notables propriétés hémolytiques *in vitro*.

Le comportement du Rat vis-à-vis des tweens 40 et 60 se montre assez différent du précédent; les courbes correspondant

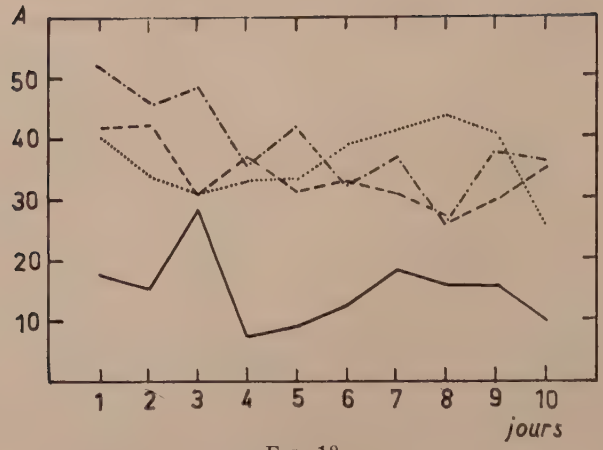


FIG. 18.

Discrimination des tweens par le Rat blanc.
Variations des valeurs du rapport A au cours de l'expérience.
En trait plein : tween 20.
En trait interrompu : tween 40.
En traits-points : tween 60.
En pointillés : tween 80.

à ces deux substances sont très rapprochées. Le premier jour, l'animal ne semble guère capable de faire de différence entre l'eau et les solutions tensio-actives, puis progressivement la préférence pour l'eau pure se manifeste, et les courbes présentent une allure régulièrement descendante. La courbe traduisant le choix dans le système eau-tween 80 est plus irrégulière mais reste cependant voisine des deux précédentes. La répulsion du Rat pour les tweens 40, 60 et 80 s'avère très modérée, car même à la fin de la période d'observation, les quantités de solutions de tweens ingérées demeurent assez importantes.

L'assez grande régularité dans les valeurs du rapport A mesuré pour les différents twens apparaît d'autant plus notable que la consommation journalière globale du liquide a été très variable pendant la durée de notre expérience, variant parfois du simple au double.

C. — INTERPRÉTATION

Dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placé, le Rat blanc est susceptible de différencier l'eau pure d'une solution de tween 20, 40, 60 ou 80. On peut admettre

que la discrimination des quatre tweens hydrosolubles par le Rat est basée sur les différences dans la constitution moléculaire de ces composés : on sait que cet animal est susceptible de différencier des odeurs homologues émanant de composés chimiques très voisins [111]. On ne peut cependant ne pas remarquer la relation assez étroite qui existe entre la tension superficielle d'une solution de tween et l'aversion du Rat pour cette même solution exprimée par la valeur moyenne correspondante du rapport A pendant la durée totale de l'expérience (tableau XXXIV et fig. 19).

TABLEAU XXXIV

COMPARAISON ENTRE LA TENSION SUPERFICIELLE DES SOLUTIONS AQUEUSES DES DIFFÉRENTS TWEENS ET L'AVERSION CORRESPONDANTE DU RAT POUR CES SOLUTIONS, EXPRIMÉES PAR LA VALEUR MOYENNE DU RAPPORT A.

AGENTS ÉTUDIÉS	TWEEN 20	TWEEN 40	TWEEN 60	TWEEN 80
Tension superficielle de la solution à 1 p. 100 en dynes/cm, à 25° C.....	36	40	43	41
Moyenne générale du rapport A	14,3	33,9	37,9	33,7

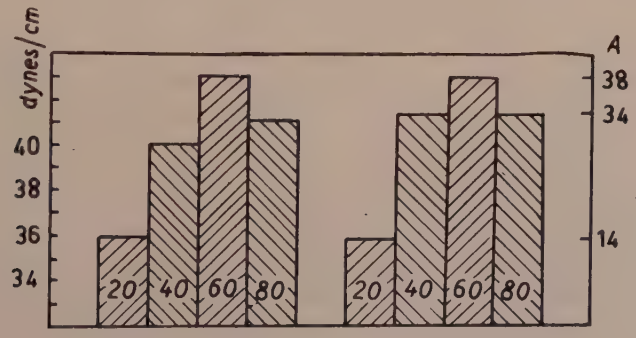


FIG. 19.

Comparaison entre la tension superficielle des solutions aqueuses des différents tweens et l'aversion correspondante du Rat pour ces solutions, exprimée par la valeur moyenne du rapport A.

L'aversion apparaît d'autant plus marquée que la tension superficielle des solutions est plus faible. Nous sommes donc conduit à émettre l'hypothèse de l'existence, chez le Rat, d'un rapport entre l'appréciation gustative d'une solution et sa tension superficielle.

VI. — ACTION DES TWEENS SUR LA GERMINATION DES GRAINES

Les expériences que nous allons décrire maintenant n'ont pas eu pour seul but d'étudier la toxicité éventuelle des tweens sur un réactif biologique végétal. Nous avons voulu également essayer de pénétrer le mécanisme du phénomène de printanisation.

On connaît de nombreuses espèces végétales qui ne parviennent à un développement complet de leurs organes végétatifs et reproducteurs qu'à la condition d'être semées en automne et de subir ainsi, à l'état de jeunes plantules, l'influence des basses températures de l'hiver. Lysenko [118], dès 1929, montra que cette influence pouvait s'exercer à n'importe quel moment de la vie de la plante et tout particulièrement sur la graine au début de sa germination.

Si l'on maintient expérimentalement des graines de céréales à basse température, pendant un temps suffisant, elles deviennent susceptibles de se développer normalement lorsqu'on les sème au printemps, tandis que les témoins, non refroidis, ne fournissent que des sujets chétifs et stériles : on transforme ainsi artificiellement un blé d'hiver en un blé de printemps. Cette « printanisation » ou « vernalisation », dont de nombreux aspects ont été étudiés par David [36, 33], apparaît comme un phénomène biologique de nature très complexe, dont le mécanisme n'est pas encore complètement élucidé. Il s'accompagne de modifications profondes des constituants chimiques de la graine, en particulier des constituants lipidiques [61, 34, 37]. Envisagé d'un point de vue biochimique, l'accroissement du pouvoir germinatif de la semence, observé à la suite de la printanisation, traduit une augmentation du métabolisme cellulaire, elle-même en rapport avec une augmentation de l'activité enzymatique. La vernalisation peut donc être considérée, du moins partiellement, comme une activation de systèmes enzymatiques sous l'influence d'un agent physique, le froid.

Il convient de rapprocher de cette action si curieuse du froid les résultats que nous avons enregistrés en étudiant, en collaboration avec Polonovski et Baudu [171, 168], l'état physico-chimique d'un enzyme du lait de vache, la xanthine-déhydrase. Le lait, recueilli à la mamelle et maintenu à une température voisine de sa température initiale, ne possède qu'une activité diastasique très faible; cette dernière activité augmente considérablement lorsqu'on soumet le lait à l'action d'une température basse. La xanthine-déhydrase est en effet un enzyme flavoprotéinique qui, dans le lait de vache, se trouve adsorbé à la surface des globules de crème en formant une cénapse lipidoprotéidique dans laquelle les groupements fonctionnels de l'enzyme sont masqués : aussi, l'activité diastasique de la cénapse est-elle très faible. Le refroidissement du lait entraîne la solidification des graisses du globule de crème, l'expulsion de certaines fractions lipidiques et, surtout, la libération de l'enzyme dans le lactoplasma. L'enzyme ainsi solubilisé confère au lait des propriétés diastasiques importantes.

Ainsi, deux phénomènes aussi éloignés à priori que la printanisation des semences et l'activité enzymatique d'un lait se rapprochent singulièrement quant à leur comportement vis-à-vis du froid : dans les deux cas, cet agent physique provoque un renforcement de l'activité enzymatique accompagné de modification des constituants lipidiques. On est donc tenté d'émettre l'hypothèse que le froid, au cours de la printanisation, libère des diastases stockées dans la graine sous forme de complexes lipidoprotéidiques inactifs au point de vue enzymatique.

Nous avions montré, en outre, que l'accroissement de l'activité xanthine-déhydrasique du lait de vache peut être également amené par l'action de différents agents chimiques modifiant la cénapse lipido-protéidique et tout particulièrement par les substances superficiellement actives ionisées [171]. Récemment, Polonovski et ses collaborateurs [170] ont signalé que la « révélation » enzymatique s'observe également sous l'action du tween 60. Nous avons recherché si les tweens, dont l'action sur le lait se montre ainsi parallèle à celle du froid, sont susceptibles d'agir d'une manière analogue sur les graines et d'amener une « printanisation chimique ». Nous avons, à cet effet, étudié l'influence des tweens sur la germination de la graine de Pin maritime.

A. — Action des tweens sur la germination de la graine de Pin maritime

Nous avons choisi pour nos essais cette espèce végétale, car ses semences présentent une germination assez irrégulière [35], très favorablement influencée par le froid qui augmente à la fois le pouvoir germinatif et l'énergie germinative [38]. D'autre part, les modifications de l'état des réserves lipidiques, particulièrement riches dans cette semence, sont très marquées au cours de la printanisation [37].

1° *Protocole expérimental*

Nous avons suivi le protocole expérimental utilisé par David *(loc. cit.)*. Nous avons disposé dans des petits cristallisoirs en verre Pyrex des semences de Pin maritime (*), à raison de 100 graines par récipient. Le premier jour de l'expérience, les graines ont été humidifiées avec 1,25 cm^3 d'eau distillée pour les séries témoins (quantité d'eau approximativement égale à 25 p. 100 du poids des graines) ou avec le même volume de solutions aqueuses de tween 20 ou 80, aux concentrations respectives de 10, 5 ou 2,5 p. 100. Pour chaque série, l'essai est effectué en triple. On recouvre ensuite les cristallisoirs d'un couvercle en verre et on les introduit dans une étuve à la température de 25° C et à l'obscurité.

On procède ensuite périodiquement à la numération des graines germées. Pendant la durée de l'expérience, on prend soin, par des brassages répétés et l'addition éventuelle de quelques gouttes d'eau distillée, de maintenir les graines bien humides (**), sans toutefois qu'elles baignent dans un excès de liquide.

2° *Résultats*

Nous avons groupé nos résultats dans le tableau XXXV.

a) Les graines de la série témoin ont présenté une vitesse de germination normale. A titre de comparaison, nous avons indiqué dans notre tableau les résultats obtenus par David pour des essais de germination réalisés en février (D_1) ou en

(*) Ces semences nous ont été aimablement fournies par M. le Professeur R. David.

(**) Les graines convenablement humidifiées sont luisantes.

mai (D_2). L'énergie germinative des graines subit en effet des variations saisonnières; les valeurs obtenues au cours de notre

TABLEAU XXXV

INFLUENCE DES TWEENS 20 ET 80
SUR LA GERMINATION DE LA GRAINE DE PIN. MARITIME (avril 1951).

LOTS (300 graines dans chaque lot)	DURÉE DE GERMINATION (en jours)												
	4	5	7	10	11	13	14	15	17	20	23	25	27
	Nombre de graines ayant germé												
Témoin	0	0	0	0	6	19	22	25	30	53	66	....	84
Témoin D 1 (*)	0	0	6	9	....	....	....	30	....	45	....	58	....
Témoin D 2 (*)	0	3	12	30	....	....	....	45	....	60	....	99	....
Tween 20 10 p. 100....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
— — 5 p. 100....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
— — 2,5 p. 100....	0	0	0	0	1	4	....	....	5	6	7	....	12
Tween 80 10 p. 100....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
— — 5 p. 100....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
— — 2,5 p. 100....	0	0	0	0	0	1	....	3	5	6	7	....	11
Graines printanisées (*).	24	54	102	156	....	....	....	159	....	180	....	183	....

(*) Les chiffres correspondant au témoin D 1 (germination en février) et D 2 (germination en mai) sont empruntés à DAVID [38] et sont donnés à titre de comparaison. Nous avons également figuré dans notre tableau les résultats obtenus par ce même auteur pour des graines ayant subi une printanisation d'une durée de cent jours.

expérience, réalisée au mois d'avril, se situent assez bien entre celles des témoins D_1 et D_2.

b) Les tweens 20 et 80 sont incapables de provoquer un phénomène de « printanisation chimique ».

Au contraire, ces substances se montrent assez toxiques vis-à-vis des semences. Les solutions à 5 et 10 p. 100 ont inhibé complètement la germination. Pour une concentration plus faible de 2,5 p. 100, correspondant à 0,36 mg de tween par graine, l'énergie germinative apparaît considérablement diminuée, n'atteignant qu'environ 13 p. 100 de la valeur du témoin. Les deux tweens étudiés semblent posséder une action très voisine. Il ne nous est malheureusement pas possible de

contrôler l'hypothèse précédemment émise concernant le mécanisme d'action du froid au cours de la printanisation, la toxicité des tweens vis-à-vis de la graine de Pin masquant la libération éventuelle d'enzymes sous forme active.

c) La toxicité des tweens vis-à-vis de la graine de Pin est cependant plus faible que celle de substances superficiellement actives non ionisées. Nous avons effectué la même expérience avec un agent anionique, le laurylsulfate de sodium, et avec un agent cationique, le méthylsulfate de méthylphényl-dodécyltriméthyl ammonium (désogène Geigy), ces deux substances étant utilisées aux concentrations de 5, 2,5 et 1,25 p. 100. Nous avons observé dans tous les cas une inhibition complète de la germination.

Nous avons voulu confirmer la toxicité des tweens vis-à-vis des semences d'autres espèces et nous avons étudié l'influence des différents tweens sur la germination du Haricot.

B. — Action des tweens sur la germination de la graine de Haricot

L'hydratation de la graine de Haricot s'effectue beaucoup plus rapidement que celle des semences du Pin maritime. Nous avons modifié en conséquence notre protocole expérimental.

Dans un petit cristallisoir, on recouvre trente graines de Haricot, de taille très voisine, avec 30 cm^3 d'eau distillée ou d'une solution du tween expérimenté. Après six heures de séjour à 25° C, les graines sont séchées avec du papier filtre. On les dépose ensuite sur un lit de plusieurs épaisseurs de papier filtre maintenu constamment humide, la température étant toujours de 25° C; à intervalles réguliers, on note le nombre de graines qui ont germé.

Nous avons effectué plusieurs séries d'expériences dont les résultats sont absolument superposables : les tweens inhibent nettement la germination, même à faible concentration. Nous avons reproduit dans le tableau XXXVI les résultats d'une expérience (lecture après vingt-quatre heures).

En réalisant les expériences précédentes, nous avons cru remarquer que le gonflement des graines s'effectuait plus rapidement en présence de tween. Pour contrôler cette impression, nous avons évalué la valeur de l'hydratation en pesant les lots de trente haricots, soigneusement séchés après zéro, deux, quatre et six heures : les résultats ont été très variables et souvent discordants. C'est qu'en effet, dans les lots de trente

TABLEAU XXXVI

Germination des graines de Haricot en présence de différents tweens (lots de 30 graines).

Nature de l'agent actif	Nombre de graines germées après vingt-quatre heures a 25° c selon la concentration de l'agent actif (g p. 100).				
	0,0	0,01	0,1	1	10
Tween 20	19	9	12	2	0
Tween 40	19	2	1	4	0
Tween 60	17	9	5	5	1
Tween 80	20	16	6	4	0

graines, un certain nombre d'individus ne s'hydratent pas ou s'hydratent beaucoup plus tardivement que les autres graines et perturbent ainsi les moyennes générales définies par les pesées globales des lots.

Pour éliminer ces graines aberrantes, nous avons repris l'étude de l'hydratation en pesant individuellement chaque graine au cours du gonflement. Cette technique, beaucoup plus longue, a néanmoins été rendue possible par l'emploi d'une balance semi-automatique (*), permettant d'effectuer en quelques secondes une pesée au 1/10e de mg. Pour chaque concentration en tween, nous avons employé dix graines. Tandis que certains lots apparaissaient parfaitement homogènes (fig. 20), d'autres, au contraire, montrent bien l'existence, à côté de graines dont l'hydratation s'effectue selon la même modalité, de graines qui s'écartent nettement du type commun (fig. 21).

Sur la figure 22, nous avons groupé les courbes représentant le pourcentage d'augmentation de poids des graines, après quatre heures de séjour dans des solutions de tween 80 à différentes concentrations. Nous n'y avons figuré, bien entendu, que les individus dont l'hydratation n'est pas aberrante.

(*) Balance Mettler (Zurich).

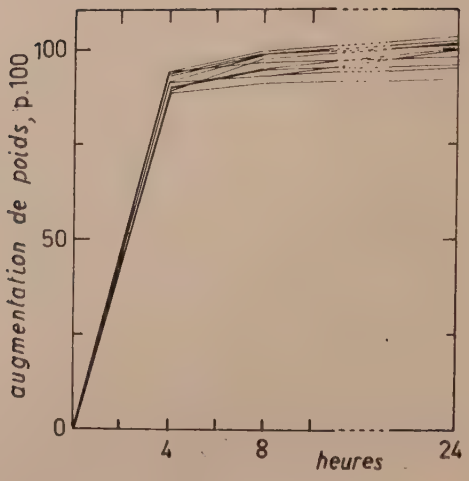


FIG. 20.

Hydratation des graines de Haricot dans une solution de tween 80 (concentration : 1 p. 100.000).

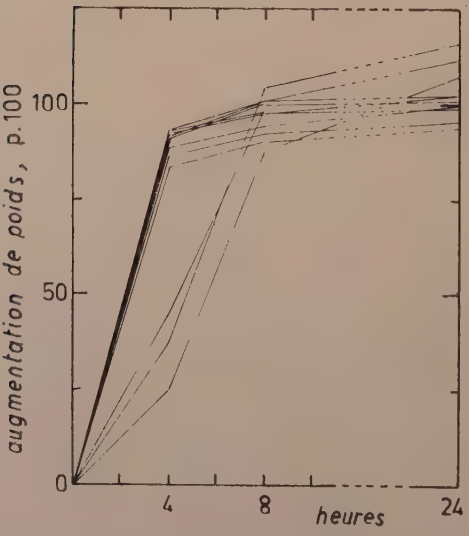


FIG. 21.

Hydratation des graines de Haricot dans l'eau distillée.

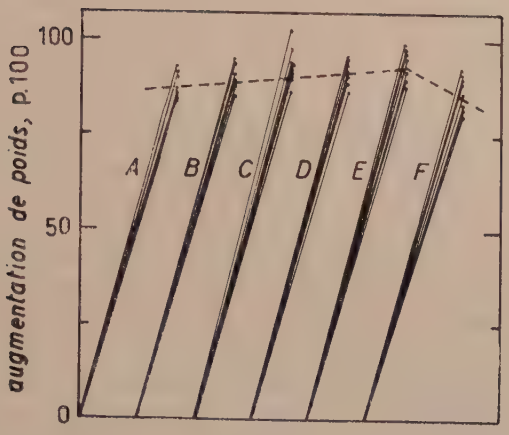


Fig. 22.

Hydratation des graines de Haricot après quatre heures de séjour dans des solutions de tween 80 à diverses concentrations :

A ..... 0 p. 100 (eau distillée) ;
B ..... 1 p. 100.000 ;
C ..... 1 p. 10.000 ;
D ..... 1 p. 1.000 ;
E ..... 1 p. 100 ;
F ..... 1 p. 10.

Nous constatons que l'hydratation n'est que très faiblement favorisée par la présence du tween 80 : le gain de poids est d'environ 10 p. 100 pour une solution d'agent actif à 1 p. 100. Une concentration supérieure (10 p. 100) inhibe au contraire légèrement l'entrée de l'eau dans la graine.

*
**

L'action inhibitrice des tweens sur la germination des graines nous conduit à formuler des réserves concernant l'emploi des tweens dans l'agriculture, comme agents émulsifiants ou solubilisants pour des produits insecticides ou anticryptogamiques non solubles dans l'eau, produits dont l'usage se généralise aujourd'hui dans les cultures. Signalons cependant qu'à la concentration de 1 p. 1.000, les tweens 20 et 80, entre les mains de Mirimanoff et Bolle [144], ne se montrent pas toxiques vis-à-vis des feuilles d'*Elodea canadensis*. A doses encore plus faibles, ils ne produisent aucun effet nocif sur la

feuille de Haricot [113], amenant cependant une augmentation de l'absorption de l'acide dichloro-2,4-iodo-5-phénoxyacétique [145].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Bien que ne possédant pas une toxicité comparable à celle des agents superficiellement actifs ionisés, les tweens ne se montrent cependant pas des substances douées d'une « neutralité » biologique absolue.

Leurs propriétés toxiques atténuées se manifestent vis-à-vis de la Daphnie qui se montre être un réactif biologique très commode pour l'étude des substances superficiellement actives. L'embryon de Poulet est tué par 25 mg de ces produits qui ne manifestent pas d'action tératogène. Les tweens provoquent une hémolyse lente des globules rouges d'Homme et de Cheval. Le tween 20, ester laurique, s'est constamment montré plus actif que les trois autres composés hydrosolubles (tweens 40, 60 et 80).

Chez le Cobaye, les tweens, introduits par voie intradermique, augmentent la perméabilité capillaire, probablement par l'intermédiaire d'une libération d'histamine.

Les dérivés de l'anhydrosorbitol inhibent fortement la germination des semences de Pin et de Haricot; pour cette dernière espèce, ils ne manifestent qu'une faible influence sur l'hydratation de la graine.

Nous avons enfin étudié la discrimination gustative des solutions des différents tweens par le Rat blanc, nos expériences suggérant l'existence d'une relation entre la tension superficielle d'une solution et sa sélection par l'animal.

CHAPITRE II

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES OBTENUES AVEC LES TWEENS

Dans la première partie de notre travail, nous avons longuement étudié un certain nombre d'associations moléculaires formées par l'union des tweens avec diverses autres substances : composés non hydrosolubles qui peuvent être ainsi « solubilisés » en phase aqueuse; substances actives ionisées dont les propriétés physicochimiques sont modifiées au sein de l'association.

Nous examinerons dans ce chapitre quelques applications biologiques de ces associations moléculaires :

1° La solubilisation de colorants liposolubles par les tweens nous a permis de mettre au point une technique de coloration « intravitale » des lipides du tissu adipeux;

2° Nous avons étudié ensuite le comportement biologique des associations moléculaires que forment les tweens avec différentes substances actives ionisées; la toxicité de ces diverses substances peut être, dans certaines conditions expérimentales, complètement masquée;

3° Le cholestérol, dans le sérum sanguin, se trouve sous une forme hydrosoluble due à son association avec des protéines et des lipides ionisés (cénapses lipidoprotéidiques). L'action des tweens sur les cénapses permet l'extraction du cholestérol par l'éther et nous a permis de préciser la constitution moléculaire de ces fractions plasmatiques.

I. — COLORATION VITALE DES LIPIDES DU TISSU ADIPEUX PAR LE NOIR SOUDAN

A. — Difficultés de la coloration vitale

La détection histochimique des lipides s'effectue le plus souvent grâce à l'emploi de pigments possédant une affinité spéciale pour les corps gras. Comme le souligne Lison [114], ces pigments ne sont pas de véritables colorants au sens habituel du terme; ils ne donnent pas lieu à des phénomènes de teinture et les colorations obtenues traduisent simplement leur dissolution dans les enclaves lipidiques cellulaires. Les solutions alcooliques de Soudan III, substance proposée dès 1896 par Daddi [31], ou de Scharlach sont le plus habituellement employées.

De nombreux auteurs ont cherché à colorer les graisses tissulaires, non pas sur des coupes histologiques obtenues après congélation, mais au sein même de l'organisme vivant. La voie d'introduction entérale des pigments, la plus simple à réaliser, a été tout d'abord employée. Daddi [31], ajoutant à la nourriture de différents animaux de l'huile colorée par le Soudan III, note qu'assez rapidement leur tissu adipeux se colore en rouge, tandis que les viscères ne fixent absolument pas de pigment. Des expériences analogues ont été effectuées par Sitowski [190], Riddle [178], Gage et Gage [71], Jacobsthal [89], Joel et Schonheimer [91], et surtout Hadjioloff [83]. Elles posent des problèmes intéressants, mais non encore complètement résolus, concernant le mécanisme de la résorption intestinale de substances non hydrosolubles et de leur transport dans l'organisme (Frazer [68]).

La coloration intravitale des lipides cellulaires, réalisée par la voie parentérale a donné des résultats contradictoires et inconstants (Read [174 bis]). Jacobsthal [89], par injection intraveineuse d'une suspension de Scharlach, observe des perturbations sanguines mais ne note aucune coloration des graisses. Joel et Schonheimer [91] ont solubilisé le Soudan III dans une solution aqueuse de désoxycholate de sodium à 10 p. 100; la solution colorée ainsi obtenue, injectée au Cobaye, par voie veineuse ou péritonéale, teinte les graisses de réserve mais tue rapidement les animaux; encore la couleur rosée observée est-elle difficile à distinguer de la couleur

normale des organes. Des essais beaucoup plus étendus ont été réalisés par Hadjioloff [82, 84] ; l'introduction d'huile d'olive saturée de Soudan III dans le sac lymphatique dorsal de la Grenouille et dans la cavité péritonéale du Rat ne lui a donné que des résultats négatifs; au contraire, l'injection de solutions alcooliques ou acétoniques des Soudans II, III, IV ou de Scharlach entraîne chez la Grenouille une bonne coloration des lipides, mais la toxicité du solvant organique rend l'expérimentation délicate; d'ailleurs Hadjioloff n'a pu obtenir de résultat positif chez les Mammifères. Des dispersions de lipocolorant dans les solutions aqueuses de savons, de saponines ou de substances hydrotropes (acides trichloracétique et sulfosalicylique) n'ont pas permis à ce même auteur de « fixer une technique qui donnerait des résultats réguliers et utilisables ».

B. — Utilisation des tweens

Les techniques d'introduction parentérale de lipocolorants utilisés par les précédents auteurs apparaissent mal adaptées aux conditions physiologiques : l'action nocive ou irritante sur l'organisme limite l'introduction en quantité suffisante du produit coloré dans le milieu intérieur et nous semble responsable des échecs observés. L'emploi d'agents superficiellement actifs non toxiques devrait éviter ces inconvénients.

Les tweens nous ont donné des résultats satisfaisants [153] et nous ont permis de réaliser des dispersions aqueuses en milieu physiologique de divers lipocolorants : Ecarlate 2 R, Soudans II et III, noir Soudan.

Nos essais ont été réalisés en majeure partie avec le noir Soudan (Sudanschwartz Grübler ou Hollborn), bien que la constitution chimique de ce tétrazoïque ne soit pas encore élucidée (*) : ce pigment possède un pouvoir colorant bien supérieur à celui des autres Soudans (Lison [114]), et l'on ne risque pas de confondre les colorations mêmes légères avec la teinte normale des tissus animaux. Sa solution hydro-alcoolique, d'une couleur bleu noir intense, est couramment utilisée pour la coloration histochimique des lipides et de la myéline [115]. Le noir Soudan est également soluble dans

(*) Le noir Soudan n'est d'ailleurs qu'un mélange de constituants mal définis. Par chromatographie de partage sur papier (phase solvante = heptane), nous avons pu montrer l'existence d'au moins six constituants différents [152].

l'huile de paraffine qu'il colore en violet : ces différences de coloration ont d'ailleurs été mises à profit par Gérard [72] pour la différenciation histochimique des lipides et des huiles minérales dans les vaselinomes.

Une solution alcoolique saturée de noir Soudan (0,18 g p. 100 environ), diluée avec de l'eau distillée, donne une suspension assez stable d'où le colorant est entièrement extractible par agitation avec un excès d'éther. Si l'on effectue la dilution avec du sérum physiologique, on observe au contraire une précipitation instantanée du colorant; les tweens 20, 40, 60 et 80 inhibent cette floculation par les électrolytes, le tween 40 se montrant le plus actif; l'inhibition est complète pour un rapport

$$R = \frac{\text{poids de noir Soudan}}{\text{poids de tween 40}} \text{ égal à } 0{,}50.$$

Le tween 40 est d'autant plus intéressant à utiliser qu'il se montre très peu hémolytique (voir p. 107).

C. — Préparation des pseudosolutions aqueuses de noir Soudan

On ajoute à un volume de solution alcoolique saturée du colorant la quantité de solution alcoolique de tween 40 à 10 p. 100 nécessaire à l'obtention d'un rapport R = 0,40, correspondant à un léger excès d'agent solubilisant. On dilue l'ensemble avec quatre fois son volume d'eau distillée puis on concentre cette solution hydroalcoolique par distillation sous pression réduite jusqu'à ce que son volume soit un peu inférieur à celui de la solution alcoolique du colorant dont on était initialement parti. On chasse ainsi la totalité de l'alcool. On filtre la pseudosolution aqueuse de noir Soudan pour éliminer les quelques particules du colorant qui se sont insolubilisées au cours de la distillation. La concentration du colorant est estimée colorimétriquement par comparaison avec la solution alcoolique saturée; on ajoute, enfin, une solution concentrée de chlorure de sodium, de manière à obtenir en définitive une pseudosolution aqueuse physiologique contenant 0,15 g p. 100 de noir Soudan.

Cette solution, conservée à la glacière (pour éviter l'hydrolyse du tween), reste stable pendant plusieurs mois. Elle ne fournit aucun dépôt après une heure de centrifugation à

6.000 tours/minute. L'éther n'extrait de cette solution que de très faibles quantités de colorant. L'hydrosulfite de sodium la décolore complètement, après obtention d'une teinte violette puis rose.

La valeur du rapport R employé ici est beaucoup plus grande que celle nécessaire à la réalisation de pseudosolutions aqueuses d'autres composés insolubles (voir p. 43). Il ne s'agit donc pas d'une solubilisation véritable avec formation de micelles mixtes, mais plutôt de la stabilisation de très fines particules de colorant par un film orienté de molécules superficiellement actives. L'observation de nos solutions au microscope permet d'ailleurs d'apercevoir, au fort grossissement, quelques fines particules de colorant, à la limite de la visibilité, animées d'un mouvement brownien intense.

La simple évaporation d'une solution alcoolique de noir Soudan et de tween 40, en proportions convenables, semblerait être une méthode de préparation encore plus simple, mais elle fournit un résidu qui, repris par l'eau, donne des pseudosolutions moins stables que les précédentes : il se produit après quelques jours, sur les parois des récipients qui les contiennent, un dépôt de noir Soudan; en outre, l'extraction par l'éther se montre plus importante. La présence d'eau favorise donc l'orientation des molécules de tween autour des particules de colorant.

D. — Coloration vitale des lipides par voie parentérale

Nous avons étudié deux voies d'introduction parentérale des pseudosolutions aqueuses de noir Soudan, la voie intraveineuse chez le Lapin et la voie intrapéritonéale chez le Rat.

Le Lapin supporte parfaitement l'injection intraveineuse de 30 mg de noir Soudan sous forme de notre pseudosolution aqueuse : vingt-quatre heures après une injection unique, on ne note aucune coloration du tissu adipeux visible macroscopiquement. Si l'on répète chaque jour une injection identique, on remarque que la fixation vitale du lipocolorant devient nette au bout d'environ quatre jours : la graisse sous-cutanée, la graisse périrénale, les localisations adipeuses mésentériques prennent une coloration bleutée caractéristique, tandis que les viscères, le foie et le rein en particulier, restent incolores ou faiblement teintés. Nous avons noté dans un seul cas une coloration marquée des poumons. Chez l'animal en période de lactation, le lait se colore fortement.

La localisation élective du colorant dans les graisses de dépôt doit être rapprochée des constatations de Frazer [68]. Cet auteur a montré que les graisses neutres sont stockées en majeure partie dans le tissu adipeux et très peu dans le foie qui fixe au contraire d'une manière préférentielle les acides gras.

La même absence de toxicité du noir Soudan se retrouve chez le Rat à qui on administre le colorant solubilisé par la voie intrapéritonéale. Certains animaux ont reçu pendant plus de vingt jours consécutifs une dose quotidienne de 4 cm^3 de notre solution (soit 6 mg de colorant) sans présenter de phénomène pathologique. La pseudosolution physiologique est résorbée partiellement à travers les lymphatiques sous-péritonéaux du diaphragme : la résorption est rapide et ces vaisseaux apparaissent dès la quinzième minute après l'injection, sous la forme de petites stries bleutées très visibles lorsqu'on regarde le diaphragme par transparence. On peut également noter la présence du colorant dans les voies efférentes de ces lymphatiques, ganglions médiastinaux antérieurs qui sont fortement colorés en noir, et à un degré moindre, ganglions lombaires. La résorption lymphatique représente la voie normale de drainage des fluides ou des particules suffisamment petites introduites dans la cavité péritonéale (Simer [188]).

La majeure partie du lipocolorant se fixe d'abord sur les diverses localisations graisseuses de la cavité péritonéale : graisses périrénale, péristernale, rétropéritonéale, supratesticulaire; les graisses de l'épiploon et les bandelettes graisseuses juxtavasculaires du mésentère présentent la coloration la plus intense et apparaissent presque noires. L'examen au microscope d'un étalement d'épiploon montre que la coloration se limite exclusivement aux vésicules adipeuses qui sont teintées de manière uniforme. Après une injection unique de colorant, seule l'assise superficielle fixe le Soudan, mais la coloration s'effectue également en profondeur quand on soumet les animaux à un traitement prolongé. Chez ces derniers, la coloration ne se limite plus à la région d'injection, elle s'étend aux autres localisations lipidiques de l'organisme (graisse médiastinale, graisse sous-cutanée). Pour les doses extrêmes, l'affinité du noir Soudan finit par déborder le tissu adipeux, et le tissu conjonctif se colore lui-même faiblement. En aucun cas nous n'avons observé la moindre fixation de Soudan au niveau du système nerveux central.

Sur les préparations histologiques de tissu coloré réalisées

selon la technique habituelle, le noir Soudan ne se retrouve pas : il s'est dissous au cours du passage de la pièce dans les bains des différents solvants (alcool, xylol, paraffine). Le colorant n'est donc pas retenu sous forme de combinaison insoluble par un constituant protoplasmique.

La fixation du lipocolorant sur les cellules à enclaves lipidiques doit s'accompagner d'une hydrolyse du tween, hydrolyse qui restitue au Soudan ses caractères habituels de solubilité : un fragment d'épiploon fortement coloré *intra vitam*, se décolore complètement lorsqu'on l'épuise par l'éther; nous avons déjà signalé que le tween peut être attaqué par les lipases cellulaires [8, 75].

L'élimination du noir Soudan fixé sur les lipides se montre très lente et plus de deux mois après une seule injection intrapéritonéale de colorant, l'épiploon et les graisses mésentériques apparaissent bien colorées.

Des essais préliminaires nous ont montré que la pseudo-solution aqueuse de noir Soudan, donnée au Rat comme boisson exclusive, se prête particulièrement bien à l'introduction quantitative du lipocolorant par voie digestive et entraîne très rapidement la coloration vitale des lipides de l'organisme.

II. — TOXICITÉ DES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES AVEC LES SUBSTANCES SUPERFICIELLEMENT ACTIVES IONISÉES.

Les tweens ne possèdent qu'une faible toxicité, surtout lorsqu'on les compare aux autres substances superficiellement actives ionisées. Nous avons signalé, d'autre part, l'existence d'associations moléculaires entre les deux types de produits, se traduisant par une augmentation de la solubilité à froid du laurylsulfate de sodium, ou par l'inhibition des phénomènes de gonflement dans le système laurylsulfate de sodium-cholestérol.

Nous nous sommes demandé quelle serait l'action biologique de solutions renfermant à la fois un tween et un agent ionisé.

A. — Toxicité des mélanges agents cationiques-tweens pour la Daphnie

Pour évaluer la toxicité des solutions mixtes, nous avons utilisé comme test biologique la survie de la Daphnie, en adoptant le même protocole que précédemment (voir p. 100). Nos premiers essais ont été réalisés avec le système désogène (*)-tween 80. Il nous ont permis de constater que la présence de tween augmente considérablement la durée de survie du crustacé en présence de l'agent cationique (tableau XXXVII).

TABLEAU XXXVII

Toxicité du désogène (0,015 g p. 100) en présence du tween 80 pour « Daphnia pulex » (lots de 10 animaux).

Concentration en tween 80 (g p. 100)	Nombre d'animaux vivants après (heures)							
	½	1	1 ½	2	2 ½	3	3 ½	4
0,00	2	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0,03	6	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0,07	7	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0,15	10	0	.....	.....	.....	.....	.....	.....
0,31	10	3	0	.....	.....	.....	.....	.....
0,62	10	8	5	0	.....	.....	.....	.....
1,25	10	10	10	10	9	8	3	0

Il faut cependant une grande proportion de tween par rapport à l'agent cationique pour obtenir une diminution nette de toxicité : quarante fois plus pour doubler le temps de survie.

(*) Méthylsulfate de méthylphényldodécyl-triméthyl-ammonium, aimablement fourni par les Laboratoires Geigy.

Le mélange contenant quatre-vingt fois plus d'agent non ionisé que de désogène tue encore la totalité des animaux en quatre heures. Notons que le tween 80, à la concentration employée, ne manifeste pas de toxicité appréciable dans les limites du temps de l'expérience. Nous avons confirmé ces résultats en étudiant l'association bradosol-tween 40 (tableau XXXVIII et fig. 23). Dans cet exemple, le rapport tween-bradosol néces-

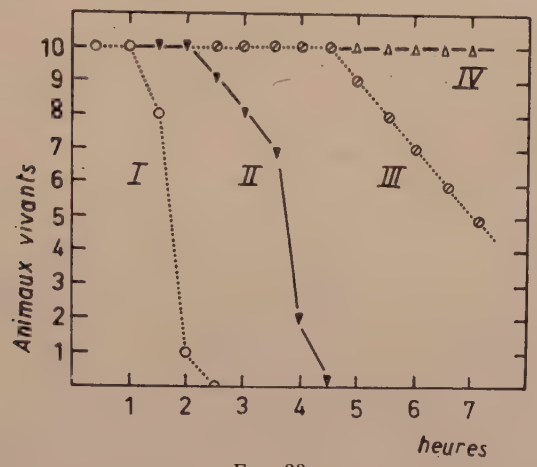


Fig. 23.

Toxicité vis-à-vis de *Daphnia pulex* du bradosol (0,0015 p. 100) en présence de tween 40.

Concentration en tween, g p. 100 :

I 0;
II 0,039;
III 0,078;
IV ..... 0,15.

saire pour détoxifier l'agent cationique possède une valeur élevée, supérieure à 100 pour assurer la survie de la moitié des Daphnies après vingt-quatre heures d'observation.

Nos résultats doivent être rapprochés de ceux de Baker, Harrison et Miller [13] qui ont observé une action antagoniste d'un ester de polyglycérol sur les actions bactéricides et bactériostatiques d'agents actifs ionisés. Kradolfer a montré également que le tween 80 pouvait inhiber l'action de différentes substances actives sur le bacille tuberculeux [99], en particulier certains savons inversés [100]. Signalons également que l'activité bactériostatique de la butoxy-2-amino-5-pyridine est partiellement masquée par le tween 80 [67].

TABLEAU XXXVIII

TOXICITÉ DU BRADOSOL EN PRÉSENCE DU TWEEN 40 POUR « DAPHNIA PULEX » (lots de 10 animaux).

CONCENTRATION EN BRADOSOL (g p. 100)	CONCENTRATION EN TWEEN 40 (g p. 100)	NOMBRE D'ANIMAUX VIVANTS APRÈS (heures)											
		½	1	1½	2	2½	3	3½	4	5	6	7	24
0,0031	0,000	10	2	0	....	....	....	....	....	....	....	....	....
	0,039	....	10	8	0	0	....	....	....	....	....	....	....
	0,078	....	....	....	10	5	1	0	....	....	....	....	....
	0,15	....	....	....	....	10	10	10	9	....	....	....	0
	0,31	....	....	....	....	....	....	....	10	10	....	....	1
	0,47	....	....	....	....	....	....	....	....	10	....	....	5
	0,62	....	....	....	....	....	....	....	....	10	....	....	5
	0,78	....	....	....	....	....	....	....	....	10	....	....	6
	0,93	....	....	....	....	....	....	....	....	10	....	....	7
0,0015	0,000	....	10	8	1	0	....	....	....	....	....	....	....
	0,039	....	....	10	10	9	8	7	2	0	....	....	....
	0,078	....	....	....	....	10	10	10	10	9	7	5	0
	0,15	....	....	....	....	....	....	....	....	10	10	10	2
	0,31	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	10	6
	0,47-0,93	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	10	7
0,00078	0,000	....	....	....	10	4	1	0	....	....	....	....	....
	0,039	....	....	....	....	10	10	10	10	10	9	8	0
	0,078	....	....	....	....	....	....	....	....	....	10	10	4
	0,15-0,93	....	....	....	....	....	....	....	....	....	....	10	8

Comment peut-on interpréter cette action des tweens ? La première hypothèse qui vient à l'esprit est que l'agent cationique a été simplement neutralisé par la petite proportion d'acide gras libre qui existe dans les solutions de tween. On s'expliquerait ainsi la quantité importante de tween nécessaire à la détoxication complète de l'agent cationique. Cette manière de voir ne peut cependant être retenue, car les tweens inhibent l'action, non seulement des composés cationiques, mais encore de dérivés anioniques, et particulièrement du laurylsulfate de sodium, substance que ne peut évidemment neutraliser un acide gras.

B. — Toxicité des mélanges laurylsulfate de sodium-tween pour la Daphnie

Le laurylsulfate apparaît beaucoup moins toxique pour la Daphnie que les ammoniums quaternaires à chaîne grasse. Aussi, le rapport tween-laurylsulfate de sodium amenant une baisse sensible de la toxicité de l'agent anionique se montre-

TABLEAU XXXIX

Toxicité du laurylsulfate de sodium (0,034 g p. 100) en présence de tween 80 vis-a-vis de « Daphnia pulex » (lots de 10 animaux).

Concentration en tween 80 (g p. 100)	Nombre d'animaux vivants après (heures)								
	½	1	1 ½	2	2 ½	3	3 ½	4	4 ½
0,00	8	2	1	0	.....	.....	....	.....	.....
0,03	10	6	3	0	....	....	....	.....	.....
0,07	10	10	10	9	6	4	2	1	1
0,15	.....	.....	....	10	8	7	5	4	2
0,31	....	.....	....	....	10	9	9	9	7
0,62	....	.....	....	....	.....	10	10	10	10

t-il bien plus faible que dans les exemples précédents (tableau XXXIX et fig. 24). L'inhibition complète de la toxicité après quatre heures et demie d'observation, se produit lorsque le milieu contient dix fois plus d'agent ionisé que de lauryl-

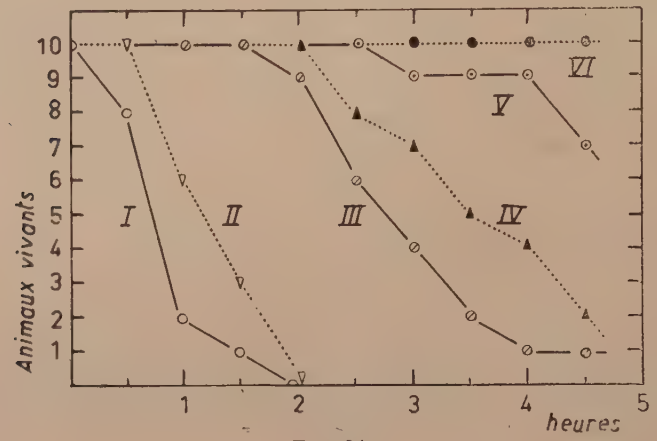


Fig. 24.

Toxicité vis-à-vis de *Daphnia pulex* du laurylsulfate de sodium (0,034 p. 100) en présence de tween 80.

Concentration en tween, g p. 100 :

I 0;
II 0,03;
III 0,07;
IV 0,15;
V 0,31;
VI ..... 0,62.

sulfate de sodium; rappelons qu'au cours de précédentes expériences (voir p. 91, tableau XXVIII), le même rapport entre les deux substances actives inhibait complètement la production de figures de gonflement dans le système cholestérol-laurylsulfate de sodium.

Ainsi donc, un phénomène physicochimique, la formation de figures myéliniques à partir d'un cristal de cholestérol par le laurylsulfate de sodium et un phénomène biologique, la toxicité de cette substance vis-à-vis d'un petit crustacé, sont influencés de la même manière par la présence du tween.

Nous sommes donc enclins à rapprocher ces deux phénomènes et à supposer que la toxicité du laurylsulfate provient, en partie au moins, de la réalisation d'une association moléculaire avec un constituant cellulaire dont il est évidemment

difficile de préciser la nature. Il peut s'agir d'un constituant lipidique des membranes cellulaires (cholestérol par exemple) dont l'association avec l'agent actif entraîne à la fois la solubilisation et la désorganisation de la structure de la membrane cellulaire; il peut s'agir également d'une protéine enzymatique dont les propriétés spécifiques sont inactivées [174].

*
**

Comment interpréter le pouvoir inhibiteur des tweens vis-à-vis de l'action des substances actives ionisées ?

Nous pouvons remarquer tout d'abord que les concentrations en tweens efficaces sont toujours supérieures à la concentration critique de formation des micelles (environ 0,5 g p. litre à la température ordinaire). On peut donc penser que l'agent ionisé forme des micelles mixtes avec les molécules de tweens, micelles à l'intérieur desquelles il se trouve en quelque sorte emprisonné. Cette explication, valable pour l'action inhibitrice d'un composé insoluble (par exemple influence du cholestérol sur l'hémolyse par un agent actif ionisé), ne semble pouvoir convenir ici : les deux composés de la micelle, tween et agent ionisé, sont tous deux très solubles dans l'eau; la micelle ne représente qu'une entité statistique et se trouve, à chaque instant, en équilibre avec la phase aqueuse intermicellaire, solution moléculaire saturée en tween et en agent actif ionisé.

Il semble préférable d'admettre l'existence d'une compétition entre les molécules de tween et celles de l'agent ionisé pour un même « récepteur ». Prenons l'exemple du cristal de cholestérol mis en présence d'une solution contenant à la fois du tween et du laurylsulfate de sodium; la fixation des deux types de molécules à la surface du cristal dépend de deux facteurs : de leur concentration relative dans la solution et de l'énergie résultant de leur association avec les molécules de stérol. En présence d'un excès d'agent non ionique, la surface du cristal sera presque exclusivement couverte de molécules de tween, incapable de donner lieu à la formation de figures myéliniques (voir page 89). Une compétition analogue existerait pour un « récepteur » cellulaire.

*
**

Nous avons enregistré des phénomènes de détoxication tout à fait analogues en étudiant l'action sur la Daphnie de mélanges d'agents actifs ioniques et d'autres composés superficiellement actifs à chaîne polyoxyéthylénique :

— Laurylsulfate de sodium - Brij 35 (*);
— — — - G. 2153 (*);
— Désogène (**) - Brij 35;
— — - G 2153.

C. — Toxicité des mélanges laurylsulfate de sodium-tween pour le Rat

Dans les expériences précédentes réalisées avec la Daphnie, le produit toxique était introduit dans le milieu liquide où vit l'animal. La « détoxication » réalisée par les tweens se produit-elle également au sein même de l'organisme ?

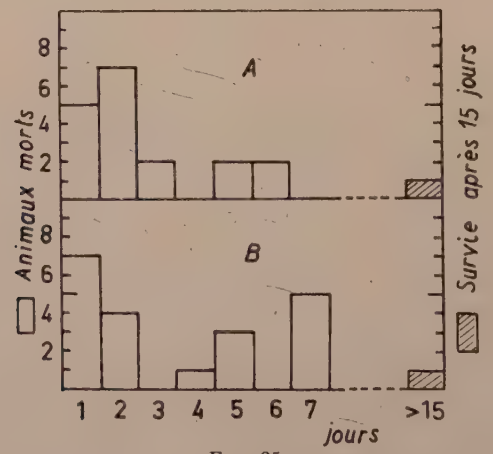


Fig. 25.

Toxicité vis-à-vis du Rat blanc du laurylsulfate de sodium introduit par voie péritonéale (200 mg/kg).

A : laurylsulfate de sodium seul;

B : laurylsulfate de sodium associé au tween 40 (1.200 mg/kg).

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences avec le système laurylsulfate de sodium-tween 40 chez

(*) Voir p. 18.
(**) Voir p. 105,

le Rat blanc; nous avons choisi ce dernier composé à cause de la faiblesse de son pouvoir hémolytique.

Nous avons tout d'abord déterminé la toxicité du laurylsulfate de sodium, injecté par voie intrapéritonéale, chez le Rat blanc; la LD_{50} est de 150 mg/kg, la LD_{100} de 300 mg/kg. Ces résultats sont voisins de ceux indiqués par Sollmann et Hanzlick [194].

Nous avons injecté par voie intrapéritonéale, à un lot de vingt rats, une dose de laurylsulfate de 200 mg/kg sous forme d'une solution aqueuse à 2 p. 100, dose un peu supérieure à la L D 50; nous avons comparé la survie des animaux à celle des individus d'un deuxième lot de vingt-deux rats qui ont également reçu par voie intrapéritonéale la même dose de laurylsulfate associée à une quantité six fois plus grande de tween 40. On n'observe dans ces conditions aucune différence significative entre les deux séries (fig. 25); vis-à-vis de la Daphnie, cette proportion tween-laurylsulfate retardait cependant considérablement l'immobilisation des animaux. On peut penser que, dans l'organisme du Rat, l'action des lipases tissulaires que nous avons déjà invoquée, détruit rapidement le tween, empêchant ainsi tout phénomène de compétition entre les substances actives ionisées et l'agent non ionique.

III. — EXTRACTION DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE

Le sérum sanguin renferme, à l'état normal, une quantité importante (6 à 8 g par litre) de lipides et de divers constituants insolubles dans l'eau (stérols, vitamines, etc.). Ce liquide apparaît cependant parfaitement limpide et homogène. On sait aujourd'hui que cette solubilité particulière des constituants lipidiques dans la phase aqueuse que représente le plasma est due aux liaisons qui les unissent aux protéides pour former les cénapses lipidoprotéidiques de Macheboeuf [125, 126, 127, 128].

A l'intérieur de ces cénapses, les lipides ont perdu une partie de leurs propriétés caractéristiques : alors que ces principes immédiats, lorsqu'ils se trouvent isolés à l'état pur, sont parfaitement solubles dans l'éther, ce dernier solvant, agité avec du sérum, n'en extrait que des traces infimes. La stabilité de ces cénapses est d'ailleurs variable : chez certains malades atteints d'ictère par rétention [204] ou soumis au traitement salicylé

[209], la simple agitation avec de l'éther enlève au sérum une fraction parfois importante de ses lipides.

On peut, *in vitro*, « décoller » une partie des substances lipoïdiques liées aux protéides sous l'action de différents réactifs : l'éther, en présence d'alcool, permet d'extraire quantitativement le cholestérol sérique (Grigaut [80]) ainsi qu'une notable proportion de phospholipides [130, 131]. L'action des savons alcalins sur le sérum permet d'extraire par l'éther une abondante quantité de lipides constitués par des phosphatides, des glycérides, des stérides et des stérols (Machebœuf et Tayeau [132, 133]). Ces résultats ont conduit Machebœuf et Tayeau à émettre l'hypothèse que, dans certaines cénapses, les lipides et les protéides seraient liés par solvatation réciproque de leurs chaînes polyméthyléniques homologues par des forces de Van der Waals.

Par la suite, Tayeau montra qu'en présence de divers saponosides phénanthréniques [202] provenant en particulier du Sapindus [208], l'éther pouvait extraire la totalité du cholestérol sérique, sans modifier les liaisons des phosphatides avec les protéines : la parenté de structure entre le cholestérol et les saponosides était en faveur d'une substitution « icélomorphique » [128], au sein des cénapses lipido-protéidiques, des molécules de stérol par des molécules de forme voisine. Cette théorie fut confirmée par l'étude de l'action sur le sérum des sels biliaires [203] et du dihydroabiétate de sodium [129] ; elle suggère également que le cholestérol se trouve uni non seulement aux protéines, mais encore aux phosphatides, lesquels contractent à leur tour des liaisons avec les protéines : on s'expliquerait ainsi les raisons pour lesquelles l'enlèvement des phosphatides provoque automatiquement le départ du cholestérol, et que le détachement du cholestérol soit possible sans que les phosphatides soient « libérées » des protéines [207]. Les phosphatides formeraient donc le trait d'union entre les protéines et le cholestérol.

En collaboration avec F. Tayeau, nous avons examiné l'extraction des lipides sériques en présence de substances actives non ionisées dérivées de l'anhydrosorbitol.

A. — Protocole expérimental

On verse dans des ampoules à décanter 10 cm³ de sérum de Cheval fraîchement recueilli et 5 cm³ d'une solution de tween 20 ou 80 à différentes concentrations. On mélange et

l'on recouvre la phase sérique de 15 cm³ d'éther préalablement privé d'alcool. On laisse en contact trois jours en agitant à plusieurs reprises très délicatement, par simple rotation de l'ampoule. Il est cependant très difficile d'éviter la formation d'émulsion, surtout dans les mélanges correspondant aux plus fortes concentrations en tween. La phase aqueuse, primitivement limpide, se trouble progressivement, surtout en présence de tween 80. Après trois jours, on sépare l'éther que l'on évapore. L'extrait éthéré est repris par le chloroforme et, sur cette solution chloroformique, on dose le cholestérol par colorimétrie et, après destruction sulfonitrique, le phosphore lipidique.

B. — Résultats — Interprétation

Nous avons groupé dans le tableau XL les résultats d'une expérience dans laquelle le sérum de Cheval utilisé contenait

TABLEAU XL

Extraction des lipides sériques par l'éther en présence du tween 20 ou 80.

Tube n°		1	2	3	4	5	6	7
Sérum de Cheval (en cm³).....		10	10	10	10	10	10	10
Solution physiologique de tween à 5 p. 100 (en cm³).....		0	0,5	1	2	3	4	5
Eau physiologique (en cm³)....		5	4,5	4	3	2	1	0
Ether (en cm³)		15	15	15	15	15	15	15
Extraction en présence de tween 20	Cholestérol γ	0	0	4.875	750	250	175	175
	P γ	0	0	12,5	20	0	0	0
Extraction en présence de tween 80	Cholestérol γ	0	4.875	3.625	750	325	250	150
	P γ	0	10	0	0	0	0	0

1,02 g de cholestérol total et 60 mg de phosphore lipidique par litre.

Nous constatons que, tandis que près de la moitié du cholestérol total se montre dans ces conditions extractible par l'éther, la présence du tween ne permet à ce solvant que d'enlever seulement des traces de phosphore lipidique. Le comportement des deux tweens examinés se montre assez analogue.

L'action des tweens se rapproche donc de celle d'autres composés actifs non ioniques, les saponosides, bien qu'il n'y ait entre eux aucune parenté de structure. L'hypothèse du remplacement icélomorphique, dans ce cas particulier, ne semble pouvoir être adoptée.

Il existe un optimum très étroit de concentration en tween permettant l'extraction du cholestérol. Il est vraisemblable qu'en présence d'un excès d'agent actif non ionique, il se forme des associations moléculaires, voisines de celles précédemment décrites (voir page 35), associations très hydrophiles et non extractibles par l'éther. L'existence de cet optimum explique probablement les résultats négatifs signalés par Charonnat [29].

Confrontons maintenant les résultats obtenus avec les hypothèses sur la structure des cénapses lipido-protéidiques.

Un premier type de modèle a été proposé par Machebœuf et Sandor [131] et par Tayeau [201]; pour ces auteurs, l'union entre la protéine et les lipides, qu'ils soient ionisés (lécithines et autres phosphatides) ou non (glycérides, stérides), s'effectuerait par la mise en jeu d'un mode de liaison unique : des forces de Van der Waals rapprocheraient les chaînes polyméthyléniques et les autres éléments de structure analogue appartenant aux deux genres de molécules (*). Si nous adoptons cette hypothèse structurale, on comprend facilement pourquoi les savons alcalins, grâce à leur chaîne polyméthylénique, « libèrent » par action de masse à la fois les deux groupes de lipides. L'extraction sélective du cholestérol en présence de composés de structure voisine (saponosides, sels biliaires, etc.) s'interprète également très bien; mais, comme nous l'avons déjà noté plus haut, la théorie de l'icélomorphisme ne peut s'appliquer à l'action des tweens pour lesquels on ne saurait invoquer la moindre parenté de constitution chimique avec les stérols. Cette théorie n'explique pas davantage les « décholestérolations » sélectives du sérum obtenues

(*) Un schéma très voisin a été proposé par Dervichian [44].

sous l'influence de divers ammoniums quaternaires à chaîne grasse (Polonovski [167]), ou sous l'influence d'une réfrigération intense (Mc Farlane [124], Delsal [43]).

Les nombreux travaux réalisés depuis quelques années concernant l'action sur les protéines des substances actives ionisées (et plus généralement des électrolytes colloïdaux) ont montré l'analogie de comportement entre les cénapses lipoprotéidiques naturelles et les associations protéines-lipides artificielles, et ont conduit Dervichian à proposer récemment une nouvelle hypothèse [49]. Les protéines seraient liées aux lipides ionisés par une interaction ionique; les lipides non ionisés, à leur tour, s'uniraient non directement à la protéine, mais aux lipides ionisés sous forme d'associations lipides-lipides. Remarquons que, dans cette hypothèse comme dans celle de Tayeau [207], les phosphatides ionisés forment le lien entre le cholestérol et la protéine. La seule différence entre les deux conceptions concerne la nature ionique ou non ionique de la liaison protéine-phosphatides [205, 78].

Si nous adoptons la deuxième hypothèse, nous pouvons interpréter sans difficulté l'action des agents actifs sur les cénapses.

Les agents non ionisés ne peuvent rompre que les liaisons faibles des associations phosphatides-lipides non ionisés, pour former avec les constituants de nouvelles associations moléculaires. Ils ne permettront donc l'extraction que du cholestérol par l'éther, et encore dans un domaine où des associations trop hydrophiles ne risquent pas de se produire. C'est ce que nous observons avec les saponosides ou avec les tweens. La nature chimique de l'agent non ionique, ou plutôt ses dimensions moléculaires doivent également entrer en jeu en favorisant plus ou moins son aptitude à fournir des associations lipides-lipides.

Les agents ionisés, au contraire, peuvent intervenir au niveau de la liaison ionique protéine-phosphatide : en leur présence, l'éther extrait à la fois des graisses neutres et des graisses phosphorées. C'est le cas des savons alcalins. Avec les saponiums, seul le cholestérol passe dans l'éther, ce qui semblerait infirmer la théorie. Rappelons cependant que l'addition de zéphirol au sérum sanguin s'accompagne de l'apparition d'un précipité floconneux renfermant les trois-quarts des lipides du sérum dont 60 p. 100 du phosphore lipidique [167].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Nous avons étudié divers aspects biologiques des associations moléculaires réalisées grâce aux tweens. Les tweens permettent l'obtention de pseudosolutions aqueuses de noir Soudan qui se prêtent à la coloration intravitale, chez l'animal, des lipides du tissu adipeux par la voie parentérale.

L'addition de tweens aux solutions aqueuses de substances actives ionisées, à des concentrations convenables, entraîne une diminution importante de la toxicité des dernières substances. Cette détoxication se manifeste vis-à-vis de la Daphnie; au contraire, l'injection parentérale au Rat de tels mélanges ne modifie pas la durée de la survie des animaux.

L'addition de tween au sérum sanguin, dans une zone étroite de concentrations, rend la moitié du cholestérol sérique extractible par l'éther. Ce solvant n'extrait dans ces conditions que des traces de lipides phosphorés. Ces constatations sont confrontées avec les hypothèses actuelles sur la nature structurale des cénapses lipido-protéidiques.

CHAPITRE III

ÉTUDE PARTICULIÈRE DE CERTAINS TWEENS

Nous avons limité notre étude à celle du tween 80 qui présente, par rapport aux trois autres tweens hydrosolubles, la particularité d'avoir une chaîne d'acide gras non saturée.

C'est le tween 80 qui avait été sélectionné par Dubos pour la réalisation du milieu synthétique qui porte son nom, destiné à la culture du bacille tuberculeux. Nous avons étudié l'influence de cet ester oléique sur la tuberculose expérimentale du Cobaye.

Nous avons également effectué la préparation d'un dérivé iodé du tween 80 dont nous avons abordé l'étude métabolique chez le Rat.

I. — TWEEN 80 ET TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

Nous avons signalé, à plusieurs reprises déjà, l'influence de certains agents superficiellement actifs non ioniques sur la croissance du bacille tuberculeux. Ces recherches furent entreprises à partir de 1945 [57] par Dubos qui montra que le tween 80 paraissait particulièrement intéressant.

En présence de ce composé, on observe, en effet, en milieu liquide synthétique, une pousse rapide du B. K. dans toute la masse du liquide : cette culture, homogène et submergée, est possible à partir de faibles inoculums. Rappelons qu'en l'absence de tween, le bacille tuberculeux se développe très lente-

ment, formant un voile granulaire à la surface des milieux de culture. Cette action favorisante du tween ne s'observe que si l'on respecte certaines conditions :

1° La concentration en tween 80 doit être comprise entre 0,02 et 0,05 p. 100;

2° Le milieu doit contenir, en outre, une certaine proportion de sérum albumine qui fixe la petite quantité d'acide gras libre toujours présente dans le tween 80;

3° Il doit être, en outre, complètement dépourvu de lipases qui, par leur action hydrolytique sur le tween, libéreraient rapidement des acides gras à une concentration bactériostatique.

Pour Dubos, l'action du tween dans le milieu de culture serait double; ce produit permettrait à la capsule cireuse du bacille d'être mouillée, d'où la pousse submergée et homogène; de plus, il agirait comme source nutritive, fournissant au B. K. un acide gras sous une forme non toxique. Les germes qui ont poussé dans ce milieu ont gardé toute leur virulence [164] et se prêtent particulièrement aux recherches expérimentales, l'homogénéité du milieu facilitant l'inoculation aux animaux de doses comparables de bacilles tuberculeux.

Le problème de l'action du tween *in vivo* n'a pas encore été abordé jusqu'ici. Il est vrai qu'il apparaît à priori fort complexe. Dans l'organisme, en effet, le tween subit l'action des lipases qui libèrent son acide gras constitutif; ce dernier composé atteindra-t-il une concentration bactériostatique ou ne sera-t-il pas plutôt absorbé par les protéines tissulaires ou humorales, sinon complètement catabolisé ?

L'influence du tween sur l'évolution de la tuberculose se présente cependant comme un problème urgent à résoudre, car le tween 80 est déjà employé dans la confection de préparations pharmaceutiques de produits non hydrosolubles qu'il maintient dispersés en phase aqueuse; on l'a préconisé dans le traitement de troubles digestifs [12]. Récemment, enfin, Pollet, Gaultier et Fournet [166], se basant sur l'augmentation de la sensibilité à différents antibiotiques que manifeste *in vitro* le B. K. en présence de tween, ont conseillé l'utilisation de cet agent non ionique comme adjuvant dans le traitement de la tuberculose pulmonaire humaine.

Nous avons étudié, en collaboration avec P. Fréour, l'influence du tween 80 sur la tuberculose expérimentale du Cobaye, en l'absence de tout traitement.

A. — Protocole expérimental

La souche de bacilles tuberculeux utilisée est une souche isolée d'une tuberculose humaine rapidement évolutive. Entretenue sur milieu de Lœwenstein, on lui fait subir deux passages sur milieu de Dubos. Au septième jour, on inocule un demi-centimètre cube de la culture aux animaux d'expérience.

Nos expériences ont été uniquement réalisées chez le Cobaye. Les animaux, tous de sexe mâle, et dont le poids est compris entre 350 et 450 g, sont divisés en quatre lots :

1° Le premier subit l'inoculation de bacilles par la voie intrapéritonéale, et l'on observe l'évolution de la maladie : c'est le lot témoin;

2° Dans le deuxième lot, les animaux sont inoculés de la même manière mais subissent, depuis l'avant-veille, une injection quotidienne de tween 80, également par voie intrapéritonéale; la dose de 200 mg/kg est administrée sous la forme d'une solution à 5 p. 100 dans l'eau physiologique;

3° Une troisième série d'animaux subit également la tuberculisation mais reçoit une injection quotidienne intrapéritonéale d'eau physiologique stérile;

4° Quelques animaux, enfin, non inoculés de bacilles, reçoivent par voie intrapéritonéale du tween 80 dans les mêmes conditions que ceux de la deuxième série.

B. — Résultats — Interprétation

Nous avons constaté que, dans les conditions de nos expériences, le tween 80 manifeste une influence activatrice sur la tuberculose expérimentale du Cobaye. La durée de survie des animaux témoins, de trente-cinq jours en moyenne, tombe à vingt jours chez les cobayes traités par le tween 80. Nous avons représenté sur un diagramme (fig. 26) les résultats d'une de nos expériences. Alors que certains animaux témoins survivent pendant près de deux mois, tous ceux qui ont reçu du tween 80 sont morts avant le trente-cinquième jour.

Cette aggravation est bien en rapport avec l'injection du produit actif et non avec le traumatisme répété représenté par les injections péritonéales. Les animaux traités par l'eau physiologique se sont comportés exactement comme les témoins.

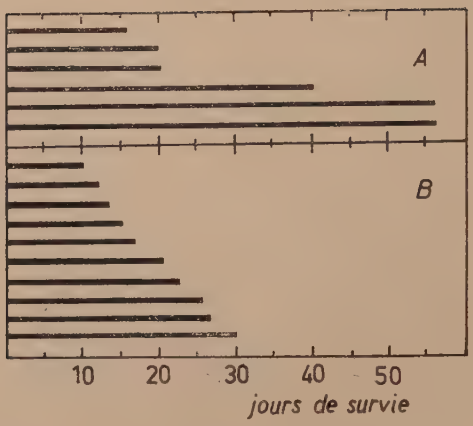


Fig. 26.

Survie des Cobayes tuberculisés.

A : animaux témoins;

B : animaux recevant du tween 80 par voie intrapéritonéale (200 mg/kg).

Nous avons suivi, au cours des expériences, la variation du poids de nos animaux. Ces données ne nous ont pas apporté de résultats bien convaincants, et l'autopsie des animaux nous en a donné la raison.

Nous avons remarqué, en effet, chez tous les cobayes tuberculisés traités au tween 80, l'existence d'une abondante ascite pouvant parfois atteindre le volume de 100 à 120 cm^3. Chez les animaux tuberculisés témoins, l'ascite se produit beaucoup plus rarement et, en aucun cas, ne présente un volume comparable. Nous avons représenté sur la figure 27 le pourcentage de diminution de poids de nos animaux des deux premières séries, après avoir éventuellement retranché celui du liquide d'ascite. Les individus qui résistent le mieux à l'injection tuberculeuse sont également ceux qui perdent le moins de poids.

En dehors de l'ascite, les cobayes traités par le tween 80 montrent des lésions beaucoup plus étendues que les animaux témoins : les nodules tuberculeux du péritoine et de la rate sont à la fois plus nombreux et plus volumineux. L'atteinte ganglionnaire est également beaucoup plus massive.

L'extension de la tuberculose au foie et aux poumons, très discrète chez les animaux témoins, apparaît souvent massive chez les cobayes traités ; on observe chez eux des foies

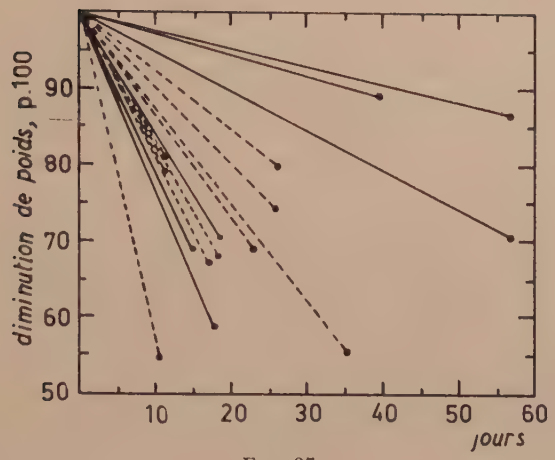


Fig. 27.

Poids des Cobayes tuberculisés.
——— Animaux témoins;
- - - - - Animaux recevant du tween 80 par voie intrapéritonéale (200 mg/kg).

« cloutés » et de nombreux foyers pulmonaires caséeux (avec parfois des réactions liquidiennes pleurales).

L'étude microscopique des foyers tuberculeux n'a pas montré de différences sensibles entre les deux séries d'animaux. Dans les deux cas, on observe des images typiques de tuberculose nodulaire avec caséification dans les foyers les plus anciens.

Chez les Cobayes non tuberculisés, l'injection quotidienne de tween 80, poursuivie pendant deux mois, n'a amené aucune manifestation pathologique.

*
**

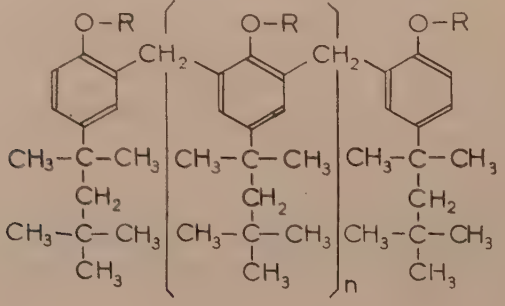
Par quel mécanisme s'effectue l'action favorisante du tween 80 sur la tuberculose du Cobaye ? Deux hypothèses peuvent être envisagées :

1° L'action favorisante n'est pas spécifique du tween 80, mais elle se produit avec toutes les substances superficiellement actives non ionisées;

2° Seul le tween 80 active l'infection expérimentale. Agit-il

alors par lui-même ou par ses produits de dégradation dans l'organisme ?

Le nombre des études consacrées à l'action des substances actives non ioniques *in vitro* sur les cultures du bacille tuberculeux contraste avec la pauvreté de la littérature scientifique concernant leur action sur la tuberculose expérimentale. Seules deux publications apportent des données sur ce point. En 1951, Cornforth, d'Arcy Hart, Rees et Stock signalaient pour la première fois qu'un produit actif non ionique, le Triton A 20, manifestait une action antituberculeuse chez la Souris [30]. Cette substance présentait le double désavantage d'être assez toxique et de ne pas posséder une structure chimique bien définie; aussi les auteurs reprirent-ils leurs expériences avec des dérivés polyoxyéthyléniques de différents produits de condensation du *p-ter*-octylphénol avec la formaldéhyde, dérivés mieux définis répondant au type de formule suivante, dans lequel R représente la chaîne polyoxyéthylénique.



Certains de ces composés se sont montrés très peu toxiques chez l'animal normal, presque totalement inactifs sur le bacille tuberculeux *in vitro,* mais possèdent cependant une nette activité antituberculeuse chez l'animal d'expérience inoculé. Les travaux de l'équipe anglaise viennent d'ailleurs d'être confirmés aux Etats-Unis par Solotorovsky et Gregory [195].

La première hypothèse doit donc être abandonnée : loin d'agir comme le tween 80, d'autres composés polyoxyéthyléniques se montrent au contraire de puissants tuberculostatiques *in vivo.* Nous avons alors pensé que le tween 80 agissait non point en tant que substance superficiellement active, mais par sa destruction rapide dans l'organisme qui apporte de

l'acide oléique, dont on connaît le rôle activateur sur la tuberculose expérimentale. Les travaux de Troteanu [214] et surtout ceux de Nègre [148, 149] ont mis en évidence l'influence aggravante des huiles riches en acides gras désaturés sur l'évolution de la tuberculose du Cobaye et du Lapin.

Nous avons alors effectué de nouveaux essais avec le tween 60, qui ne diffère du tween 80 que par le remplacement de l'acide oléique par son homologue saturé, l'acide stéarique. Le protocole expérimental a été identique.

Nous n'avons jusqu'ici effectué nos essais que sur 20 animaux (10 témoins, 10 traités), et nos résultats ne sauraient encore être définitifs. Il apparaît cependant que le tween 60 ne modifie pas l'évolution de la tuberculose du Cobaye et diffère donc profondément du tween 80. Dans notre série témoin, la survie moyenne a été de trente-deux jours; elle est de 29 jours chez les animaux recevant le tween 60 par voie intrapéritonéale. A l'autopsie, on note chez tous les animaux, traités ou non, des lésions présentant la même extension.

Nos constatations sont à rapprocher de celles de Nègre [150] qui, il y a quinze ans déjà, attirait l'attention sur les propriétés opposées du stéarate et de l'oléate d'éthyle sur la tuberculose expérimentale. Cette différence de comportement des acides oléique et stéarique chez l'animal tuberculisé apparaît d'autant plus curieuse que l'on observe *in vitro* également une différence entre les deux acides gras, mais de sens opposé. La toxicité des acides gras sur les cultures de B. K. est proportionnelle au nombre de doubles liaisons existant dans leur molécule [11, 15, 19, 86, 98, 197]. La différence entre les acides éthéniques et saturés a bien été mise en évidence également par Loebel et collaborateurs [116] : dans les cultures, l'oléate, le stéarate et le palmitate sont très efficaces pour stimuler la respiration des cellules microbiennes sur un milieu peu nutritif, l'oléate se montrant le plus actif pour stimuler le métabolisme dans la première partie de l'expérience. Cependant, tandis que le Qo_2 demeure élevé pendant plusieurs heures quand on utilise le stéarate ou le palmitate comme substrats, dans les préparations avec l'oléate, le Qo_2 tombe rapidement à des valeurs inférieures à celles des témoins. En d'autres termes, l'acide oléique se comporte comme un stimulateur ou un inhibiteur du B. K., selon le moment où l'on effectue les mesures de respiration.

Des recherches complémentaires sont cependant nécessaires pour comprendre la différence d'action *in vivo* et *in vitro* des

acides désaturés. Quoi qu'il en soit, il nous paraît utile d'émettre des réserves sur l'emploi thérapeutique du tween 80 chez les malades atteints de tuberculose, que ce produit soit utilisé comme adjuvant associé à des substances tuberculostatiques, ou simplement comme véhicule solubilisant ou émulsifiant dans des préparations pharmaceutiques.

II. — ÉTUDE D'UN DÉRIVÉ IODÉ DU TWEEN 80

Nous avons signalé, maintes fois déjà, que les tweens subissent au sein de l'organisme l'action des lipases qui en détachent l'acide gras. Pour étudier d'une manière plus précise cette hydrolyse, il serait utile de « marquer » l'acide gras constitutif de l'agent actif non ionique : l'emploi d'un radioisotope serait particulièrement commode. Grâce à l'obligeance de M. le Professeur Blanquet, nous avons pu disposer à la Fondation Bergonié d'iode radioactif ^{131}I. Nous avons alors examiné la possibilité de préparer des dérivés iodés des tweens.

A. — Préparation d'un dérivé iodé du tween 80

Le tween 80, dont la chaîne grasse possède une fonction éthénique, semble particulièrement indiqué. Cet agent actif, bien déshydraté par séjour au dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique, se dissout facilement dans le chloroforme en donnant une solution parfaitement limpide. Nous avons ajouté à cette solution chloroformique des quantités variables d'iode, également en solution chloroformique, allant jusqu'à la quantité maximum théorique (2 atomes d'iode par molécule d'acide oléique, c'est-à-dire par molécule de tween). La coloration rose de la solution d'iode disparaît : il se forme donc bien un composé iodé du tween. Après deux heures de contact, la solution chloroformique est évaporée au bain-marie : il reste un résidu huileux de couleur ambrée pour les faibles proportions d'iode, noirâtre ensuite. Ce résidu, repris par l'eau, s'y dissout parfaitement en donnant une solution brune dont la teinte est proportionnelle à la quantité d'iode.

La recherche de l'iode libre dans cette solution aqueuse, par le réactif de Tromsdorff, par exemple, se montre négative tant que le rapport $\frac{\text{poids d'iode}}{\text{poids de tween 80}}$ reste inférieur à 0,10;

de même, dans ces limites, la solution aqueuse ne cède pas d'iode au chloroforme lorsqu'on l'agite avec ce solvant. L'obtention d'un composé iodé stable n'est donc possible que pour une teneur en halogène bien inférieure au pourcentage maximum théorique qui est de $\frac{2 \times 127}{1060}$, donc voisin de 25 p. 100.

B. — Préparation d'un dérivé iodé du tween 80 marqué avec ^{131}I

L'iode radioactif nous est fourni sous la forme d'une solution aqueuse d'iodure de sodium. Pour obtenir l'iode radioactif, nous avons employé comme agent d'oxydation le sulfate de fer sous forme d'alun ferrique; l'extraction de l'iode s'effectue ensuite par agitation avec du chloroforme; dans nos conditions expérimentales, le rendement était de 50 p. 100 environ.

Pour réaliser, à partir du tween 80, un dérivé iodé radioactif, nous avons ajouté à la solution d'iodure marqué une certaine quantité d'iodure de sodium ordinaire qui sert d'entraîneur.

Après oxydation et extraction, l'iode est dosé colorimétriquement, et l'on ajoute à la solution chloroformique de l'halogène, préalablement déshydratée sur sulfate de sodium anhydre, une solution chloroformique de tween 80, de manière à ce que l'« iodotween » ainsi réalisé renferme 0,5 p. 100 d'iode. Après évaporation du chloroforme, le composé iodé est dissous dans l'eau physiologique. La radioactivité de cette solution est mesurée au compteur de Geiger-Muller.

C. — Etude biologique du iodotween

Nous avons commencé, avec la collaboration de P. Blanquet, l'étude biologique des iodotweens. Cette étude n'est pas encore terminée et nous n'en donnerons ici que les résultats préliminaires.

L'iodotween est injecté au Rat blanc par voie intrapéritonéale, sous forme d'une solution à 10 p. 100 renfermant donc 0,05 p. 100 d'iode total; les doses sont de 10 cm^3/kg. La radioactivité de la solution, variable dans les différentes expériences, est toujours voisine de 0,05 millicurie par cm^3.

On sacrifie les animaux à des temps variables après l'injection de l'iodotween et l'on mesure au compteur de Geiger la radio-activité de différents organes et différents tissus : poumon, foie, rate, rein, pancréas, sang, surrénale, muscle de la paroi abdominale, ganglion mésentérique, graisse mésentérique et thyroïde. Le nombre de coups/minute enregistré se montre partout très faible sauf au niveau de cette dernière glande dont on connaît le pouvoir fixateur vis-à-vis des iodures circulants [108, 162, 93]. Nous avons représenté sur la figure 28 l'activité des thyroïdes (*) d'une série d'animaux sacrifiés après vingt-deux, trente, quarante-huit, cinquante-cinq, soixante et onze, soixante-dix neuf, quatre-vingt seize et cent quatre heures. On note que c'est à partir du deuxième jour environ après l'injection que la radioactivité de la glande

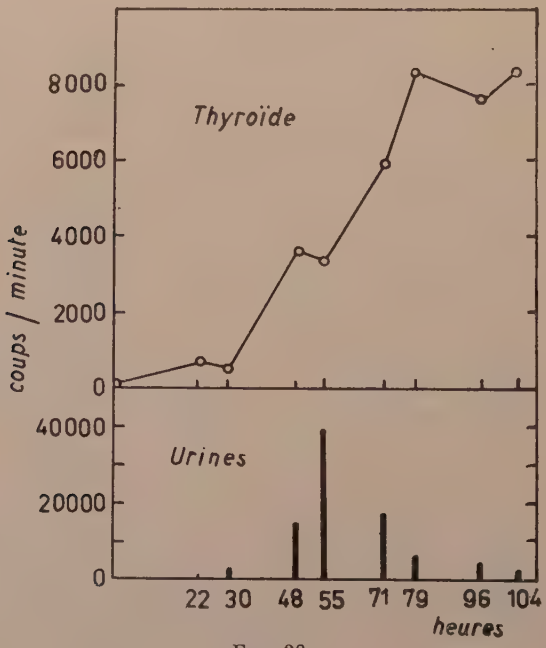


Fig. 28.

Fixation par la thyroïde et élimination urinaire de l'^{131}I après injection unique d'un dérivé iodé du tween 80.

(*) Nous avons indiqué l'activité globale des deux lobes et non l'activité spécifique (activité rapportée au milligramme de tissu) en raison des difficultés de la dissection minutieuse des thyroïdes.

prend une valeur élevée. C'est également à ce moment que l'on note l'apparition d'une radioactivité importante dans l'urine (partie inférieure de la figure 28).

Ces résultats ne peuvent s'interpréter qu'en admettant une hydrolyse de la partie grasse du iodotween, au cours de laquelle l'halogène passe dans le milieu circulant sous forme d'iodures. Nous confirmons donc ainsi, *in vivo,* la possibilité d'hydrolyse des tweens signalée *in vitro* par Gomori [75] et Archibald [8]. Nos expériences démontrent, en outre, que la présence d'iode sur la chaîne méthylénique d'un acide gras ne gêne pas son attaque par les enzymes tissulaires. Les iodures sont en partie éliminés dans l'urine et en partie fixés dans le corps thyroïde. La montée régulière des valeurs de la radio-activité dans la glande, pendant les quatre premiers jours, montre que l'hydrolyse de l'iodotween s'effectue très lentement, car une brusque montée de l'iodémie sature la thyroïde en iode. Rappelons que le nombre de coups/minute enregistrés au niveau du sang a toujours été faible. Après le cinquième jour, on assiste à une chute lente de la radio-activité au niveau de la thyroïde.

Nous avons répété des expériences analogues en injectant au Rat, toujours par voie intrapéritonéale, la même quantité totale d'iode que dans les essais précédents, mais sous forme d'iodure de sodium, la solution présentant la même radio-activité que celle du iodotween. Dans ces conditions, l'élimination urinaire se montre plus précoce et les valeurs de la radio-activité observées au niveau de la thyroïde se montrent, à partir de la trentième heure, plus faibles qu'après l'injection de iodotween, et décroissent ensuite rapidement : l'injection d'iodures réalise une véritable « inondation » de l'organisme, bloquant l'activité de la thyroïde, tandis que les iodures s'éliminent en majeure partie par la voie urinaire.

L'iodotween apparaît donc comme une substance capable de s'hydrolyser lentement en libérant son iode d'une manière régulière et progressive.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Le tween 80, qui favorise *in vitro* la pousse du bacille tuberculeux dans les cultures, aggrave notablement la tuberculose expérimentale du Cobaye quand on l'injecte quotidiennement à cet animal, par voie intrapéritonéale, à la dose de 200 mg/kg;

la durée de survie moyenne des animaux traités passe de trente-cinq jours à vingt jours, et les lésions se montrent plus extensives. Cette action apparaît due non pas aux propriétés de surface du tween, mais à son hydrolyse dans l'organisme avec libération d'acide oléique. Le tween 60, homologue stéarique, ne possède pas la même action favorisante.

Nous avons préparé un dérivé iodé stable du tween 80 et abordé son étude en mettant en jeu l'iode radioactif ^{131}I. Ce composé est hydrolysé dans l'organisme, libérant progressivement l'halogène qui est capté par la glande thyroïde.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le groupe des substances superficiellement actives, limité traditionnellement pendant des siècles aux savons et aux saponines, s'est enrichi depuis cinquante ans, grâce aux progrès de la chimie de synthèse, d'un nombre considérable de nouveaux représentants.

Notre étude porte sur des composés non ioniques, les dérivés polyoxyéthyléniques d'esters gras d'anhydride de sorbitol, habituellement désignés sous leur appellation abréviative de tweens. Nous avons examiné divers aspects de leurs propriétés physicochimiques et biologiques.

I

Les tweens sont des substances amphipathiques dont la molécule possède un pôle hydrophobe représenté par la chaîne polyméthylénique d'un acide gras et une chaîne polyoxyéthylénique fortement hydrophile susceptible de fixer au niveau de ses atomes d'oxygène des molécules d'eau par formation de ponts hydrogène.

Les différents tweens sont solubles dans l'eau pure et les solutions faiblement salines. Une élévation de température ou une forte concentration saline les insolubilisent. Les solutions aqueuses apparaissent stables et, après stérilisation, se conservent très longtemps. Les tweens se montrent des composés stables, résistant à l'irradiation ultrasonique.

Comme toutes les substances superficiellement actives, les tweens possèdent, vis-à-vis des substances non hydrosolubles, des propriétés solubilisantes qui traduisent leurs possibilités de former des associations moléculaires. La solubilisation par les tweens a été étudiée en mettant en jeu deux techniques différentes :

— La technique directe, où l'on examine le comportement

en phase aqueuse de solutions dans les différents tweens de composés insolubles dans l'eau;

— La technique de l'indice de dilution aqueuse, où l'on observe l'aspect d'une solution alcoolique du tween et de la substance non hydrosoluble à laquelle on ajoute des quantités croissantes d'eau distillée.

La deuxième technique nous est apparue plus nuancée que la première : elle permet en particulier de s'apercevoir que certaines associations moléculaires entre le twen et diverses substances insolubles dans l'eau sont moins solubles en milieu hydroalcoolique que la substance même dont on veut étudier la solubilisation.

Ces particularités de la solubilisation semblent spécifiques des tweens et dépendent de la nature chimique du groupement hydrophile de ces agents. Lorsqu'un composé insoluble dans l'eau possède une fonction hydrophile susceptible de donner lieu à la formation de ponts hydrogène, il se fixe sur les groupements oxyéthyléniques de l'agent solubilisant; il en résulte à la fois pour la substance à solubiliser, la dissimulation de sa fonction hydrophile, et pour le groupement oxyéthylénique intéressé du tween, l'impossibilité de s'hydrater : d'où la formation d'associations moléculaires faiblement hydrosolubles, parfois même moins solubles que le composé initial. Ainsi s'explique le fait que la solubilisation du thymol, du chloroforme ou de l'acide oléique, par exemple, substances respectivement plus hydrophiles que le menthol, le tétrachlorure de carbone et l'oléate d'éthyle, nécessite une quantité de tween plus grande que celle nécessaire pour entraîner en phase aqueuse ces trois derniers composés.

Certains tweens non hydrosolubles donnent au contact de l'eau des images de gonflement qui se présentent sous la forme de figures myéliniques typiques, fixant électivement les colorants basiques. Les tweens hydrosolubles possèdent une grande aptitude à donner des filaments myéliniques lorsqu'on met en présence d'eau leurs associations moléculaires avec de nombreux composés insolubles à structure linéaire. Cette aptitude provient de leur configuration chimique et en particulier de l'existence dans leur molécule d'une partie cyclique qui gêne la cohésion entre les chaînes grasses. On ne peut observer de figures myéliniques en mettant un composé non hydrosoluble en présence d'une solution aqueuse de tween.

Les tweens peuvent enfin donner des associations moléculaires avec des substances superficiellement actives ionisées.

II

Les propriétés physicochimiques particulières des tweens entraînent également, dans le domaine biologique, des propriétés qui donnent à ces agents non ioniques une place spéciale parmi les autres substances superficiellement actives.

Bien que ne possédant pas une toxicité comparable à celle des agents actifs ionisés, les tweens ne se montrent cependant pas des substances douées d'une « neutralité » biologique absolue. Leurs propriétés toxiques atténuées se manifestent vis-à-vis de la Daphnie qui se montre être un réactif biologique très commode pour l'étude des substances superficiellement actives. L'embryon de poulet est tué par 25 mg de ces produits qui ne manifestent pas d'action tératogène. Les tweens provoquent une hémolyse lente des globules rouges d'Homme et de Cheval. Le tween 20, ester laurique, s'est constamment montré plus actif que les autres composés hydrosolubles. Chez le Cobaye, les tweens, introduits par voie intradermique, augmentent la perméabilité capillaire, probablement par l'intermédiaire d'une libération d'histamine.

Ces dérivés de l'anhydrosorbitol inhibent fortement la germination des semences de Pin et de Haricot : chez cette dernière espèce, ils ne manifestent qu'une faible influence sur l'hydratation de la graine. Ces produits nous ont servi à réaliser des expériences sur le comportement alimentaire du Rat blanc qui se montre capable de réaliser la discrimination gustative des solutions des différents tweens; nos résultats suggèrent l'existence d'une relation entre la tension superficielle d'une solution et sa sélection par l'animal.

Les tweens nous ont également permis d'obtenir des pseudo-solutions aqueuses de noir Soudan qui, dénuées de toxicité, se prêtent particulièrement chez l'animal à la coloration intravitale des lipides du tissu adipeux par la voie parentérale.

L'addition de tweens aux solutions aqueuses de substances actives ionisées à des concentrations convenables, entraîne une diminution importante de la toxicité de ces dernières substances. Cette détoxication se manifeste vis-à-vis de la Daphnie; au contraire, l'injection parentérale au Rat de tels mélanges ne modifie pas la durée de la survie des animaux.

En présence de tween, l'éther se montre capable d'extraire du sérum sanguin la moitié du cholestérol qui s'y trouve sous

forme de « cénapses ». Ce solvant, dans les mêmes conditions, n'extrait que des traces de lipides phosphorés. Ces constatations sont confrontées avec les hypothèses actuelles sur la nature structurale des cénapses lipidoprotéidiques.

Le tween 80, qui favorise *in vitro* la pousse du bacille tuberculeux dans les cultures, aggrave notablement la tuberculose expérimentale du Cobaye quand on l'injecte quotidiennement à cet animal par voie intrapéritonéale à la dose de 200 mg/kg; la durée de survie moyenne des animaux traités passe de trente-cinq à vingt jours, et les lésions se montrent plus extensives. Cette action apparaît due non pas aux propriétés de surface du tween, mais à son hydrolyse dans l'organisme avec libération d'acide oléique. Le tween 60, homologue stéarique, ne possède pas la même action favorisante.

Nous avons préparé un dérivé iodé stable du tween 80 et abordé son étude en mettant en jeu l'iode radioactif ^{131}I. Ce composé est hydrolysé dans l'organisme, libérant progressivement l'halogène qui est capté par la glande thyroïde.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ambrose A. M., *J. Pharmacol.*, 1947, **90,** 359.
2. Ancel P., *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **144,** 1333-1334.
3. Ancel P., La chimiotératogénèse, 1 vol., Doin édit., Paris, 1951.
4. Anderson B. G., *Sewage Works J.*, 1944, **16,** 1156-1165.
5. Anderson B. G., *Sewage Works J.*, 1946, **18,** 82-87.
6. Anderson B. G., *Trans. am. Fisheries Soc.*, 1948, **78,** 96-113.
7. Anson M. L., *J. gen. Physiol.*, 1939, **23,** 239.
8. Archibald R. M., *J. biol. Chem.*, 1946, **165,** 443-448.
9. Aschkenasy-Lelu P., *Ann. Nutrit. Alim.*, 1949, **3,** 277-314.
10. Aschkenasy-Lelu P., *Arch. Sc. physiol.*, 1951, **5,** 3-17.
11. Avery O. P., *J. am. med. Assoc.*, 1918, **71,** 2050.
12. Badenoch J., Truelove S. C. & Ward Mc Quaid J. N., *Lancet*, 3 mars 1951, p. 508.
13. Baker Z., Harrison R. W. & Miller B. F., *J. exptl. Med.*, 1941, **74,** 621.
14. Baylor E. R., *Biol. Bull.*, 1942, **83,** 165.
15. Bergström S., Theorell H. & Davide H., *Nature*, 1946, **157,** 306.
16. Billard G., *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **92,** 1352.
17. Billard G., *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **96,** 13.
18. Binet L., *Presse Médicale*, 6 février 1937, p. 191.
19. Boissevain C., *Am. Rev. Tuberc.*, 1926, **13,** 84.
20. Booij H. L., *in* H. R. Kruyt, Colloid Science, vol. II. Reversible systems. 1 vol., 753 p., Elsevier Publ. C°, Amsterdam, 1949; ch. XIV, pp. 681-722.
21. Brohult S., *Nature*, 1937, **140,** 805.
22. Brohult S., *Nova Acta regia Soc. Sci. upsaliensis*, 1940, **12,** 6-69.
23. Browaeys J. & Dervichian D., *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140,** 136-138.
24. Cambar R. & Haget A., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1943, **81,** 70.
25. Cambar R. & Haget A., *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138,** 582.

26. Caujolle F. & Stanislas E., *C. R. Acad. Sc.*, 1951, **232,** 766.
27. Césaire F., Th. Doct. Pharm., Alger, 1949.
28. Chaix P., Lacroix L. & Fromageot C., *Biochim. biophys. Acta*, 1948, **2,** 57-63.
29. Charonnat R., Charonnat S. & Giono P., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31,** 452-456.
30. Cornforth J. W., d'Arcy Hart P., Rees R. J. W. & Stock J. A., *Nature*, 1951, **168,** 150.
31. Daddi L., *Arch. ital. Biol.*, 1896, **26,** 143.
32. David R., *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224,** 146-147.
33. David R., *J. Rech. Lab. Bellevue*, C. N. R. S., 1947, n° 1, pp. 3-14.
34. David R., *J. Rech. Lab. Bellevue*, C. N. R. S., 1947, n° 2, pp. 85-95.
35. David R., *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142,** 1545-1546.
36. David R., *Année biologique*, 1950, **26,** 413-446.
37. David R., Boudon S. & Guéridon A., *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145,** 718-720.
38. David R. & Guéridon A., *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145,** 715-717.
39. Davidson & Sobel, *J. Invest. Dermat.*, 1949, **12,** 221-228.
40. Davis B. D., *Arch. Biochem.*, 1947, **15,** 351-358, 359-364.
41. Davis B. D. & Dubos R. J., *J. Bact.*, 1948, **55,** 11-23.
42. Delaunay A., Lebrun J., Foucquier E. & Ho-Shen-Wang, *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144,** 58-59.
43. Delsal J. L., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31,** 122-125.
44. Dervichian D., *J. Chim. Physique*, 1941, **38,** 59.
45. Dervichian D., *Corps gras Savons*, 1944, **2,** 164-171.
46. Dervichian D., *C. R. Acad. Sc.*, 1944, **219,** 679.
47. Dervichian D., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **28,** 433-434.
48. Dervichian D. G., *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77,** 93.
49. Dervichian D. G., *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6,** 7-15.
50. Dervichian D. G., *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78,** 609-623.
51. Dervichian D. & Joly M., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **28,** 426-432.
52. Dervichian D. & Lachampf F., *Bull. Soc. chim. France*, 1945, **12,** 189-206.
53. Dervichian D. & Magnant C., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, **28,** 419-426.
54. Dervichian D. & Magnant C., *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140,** 94-95.
55. Dervichian D. & Magnant C., *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140,** 95-97.
56. Domagk G., *Deut. med. Wochenschr.*, 1935, **61,** 829-832.
57. Dubos R. J., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1945, **58,** 361-362.
58. Dubos R. J. & Davis B. D., *J. exptl. Med.*, 1946, **83,** 409-423.
59. Dubos R. J., Davis B. D., Middlebrook G. & Pierce C., *Am. Rev. Tuberc.*, 1946, **54,** 204-212.

60. Dubos R. J. & Middlebrook G., *Am. Rev. Tuberc.*, 1947, **56**, 334-345.
61. Dupéron R., *Rev. gén. Bot.*, 1946, **53**, 525-557.
62. Edelmann E. C. & Cathcart W. H., *Cereal Chem.*, 1949, **26**, 345-358.
63. Eistert B., 1 vol., F. Enke édit., Stuttgart, 1938.
64. Evans, Wollenweber, Ruppersberger & Krantz, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1942, **51**, 222-223.
65. Farris E. J. & Griffith J. Q., The Rat in laboratory investigations, 1 vol. 542 p., 2e édition, J. B. Lippincott C°, édit., Philadelphia, 1949.
66. Fauré-Frémiet E. & Thaureaux J., *Biochim. biophys. Acta*, 1949, **3**, 536-548.
67. Forrest, d'Arcy Hart S. P. & Walker, *Nature*, 1947, **160**, 94.
68. Frazer A. C., *J. Physiol.*, 1943, **102**, 306.
69. Frazer A. C., *Physiol. Rev.*, 1946, **26**, 103.
70. Friedel G., *Ann. Phys.*, 1922, 9e sér., **18**, 273.
71. Gage H. & Gage P., *Science*, 1908, **28**, 494.
72. Gérard P., *Bull. Hist. appl.*, 1935, **12**, 92-93.
73. Glassman H. N., *Bact. Rev.*, 1948, **12**, 105.
74. Glasstone S., *Trans. Faraday Soc.*, 1937, **33**, 200.
75. Gomori G., *Proc. Soc. exptl. Biol.*, 1945, **58**, 362.
76. Gonick E. & Mc Bain J. W., *J. am. chem. Soc.*, 1947, **69**, 334-336.
77. Gordy W., *J. am. chem. Soc.*, 1938, **60**, 605-612.
78. Gorter E. & Hermans J., *Proc. nederl. Akad. Wet.*, 1942, **45**, 808.
79. Green A. A. & Mc Bain J. W., *J. phys. coll. Chem.*, 1947, **51**, 286-298.
80. Grigaut A., *C. R. Soc. Biol.*, 1911, **71**, 513-515.
81. Grossman M. I. & Robertson C. R., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1948, **68**, 550-552.
82. Hadjioloff A., *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 1501-1503.
83. Hadjioloff A., *Bull. Hist. appl.*, 1938, **15**, 80-98.
84. Hadjioloff A., *Bull. Hist. appl.*, 1938, **15**, 113-129.
85. Hendry E. B., *Edinburgh med. J.*, 1948, **55**, 142-152.
86. Hettche H. O. & Weber B., *Biochem. J.*, 1945, **39**, 78.
87. Hopper S. S., Hulpieu H. R. & Cole V. V., *J. am. pharm. Assoc.*, Sc. Ed., 1949, **38**, 428-432.
88. Horn W. M. Van, Anderson J. B. & Katz M., *Trans. am. Fisheries Soc.*, 1949, **79**, 55-63.
89. Jacobsthal E., *Centr. allg. Path.*, 1909, **20**, 512.
90. Jensen R., Th. Doct. ès Sc., en préparation.
91. Joel E. & Schönheimer R., in *Centr. allg. Path.*, 1924, **34**, 625.
92. Johnson A. L., Scott R. B. & Newman L. H., *Am. J. Dis. Child.*, 1950, **80**, 545-550,

93. Joliot F., Courrier R., Poumeau-Delille Y. & Sue A., *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **139,** 278.
94. Jones C. M., Culver P. J., Drummey G. D. & Ryan A. E., *Ann. int. Med.*, 1948, **29,** 1.
95. Kellner A., Correll J. W. & Ladd A. T., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1948, **67,** 25.
96. Kellner A., Correll J. W. & Ladd A. T., *J. exptl. Med.*, 1951, **93,** 373-383.
97. Kellner A., Correll J. W. & Ladd A. T., *J. exptl. Med.*, 1951, **93,** 385-398.
98. Kodicek E. & Worden A. N., *Nature*, 1946, **157,** 587.
99. Kradolfer F., *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1949, **12,** 602-607.
100. Kradolfer F., *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1950, **13,** 326-339.
101. Kramer B., Sobel A. E. & Gottfried S. P., *Am. J. Dis. Child.*, 1947, **73,** 543.
102. Krantz J. C. Jr, Carr C. J., Bird J. G. & Cook S., *J. Pharmacol exptl. Therap.*, 1948, **93,** 188-195.
103. Krantz J. C. Jr, Carr C. J., Bubert H. M. & Bird J. G., *J. Pharmacol. exptl. Therap.*, 1949, **97,** 125-128.
104. Lacassagne A., Chamorro A. & Buu-Hoï N. P., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144,** 95-96.
105. Laing M. E., *Trans. chem. Soc.* (London), 1918, **113,** 435.
106. Langmuir, cité par Nageotte, pp. 1-25.
107. Lawrence C. A., Surface active quaternary Ammonium Germicides, 1 vol., 245 p., Academic Press Publ., N. Y., 1950.
108. Leblond C. P. & Sue P., *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133,** 543.
109. Lecocq R., *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145,** 1817.
110. Lelu-Aschkenasy P., *Bull. Soc. Phys. Alim.*, 1945, **33,** 55-64.
111. Le Magnen J., *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144,** 1319.
112. Linde S., *Acta physiol. scand.*, 1950, **21,** suppl. n° 74.
113. Linder P. J., Mitchell J. W. & Wood J. W., *Science*, 1950, **111,** 518-519.
114. Lison L., *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115,** 202-205.
115. Lison L. & Dagnélie J., *Bull. Hist. appl.*, 1935, **12,** 85-91.
116. Loebel R. O., Shorr E. & Richardson H. B., *J. Bact.*, 1933, **26,** 139.
117. Loew L., Sobel A. E. & Alture-Werber E., *J. Lab. clin. Med.*, 1949, **34,** 67-73.
117 bis. Loiseleur J. & Petit M., *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 568.
118. Lysenko, cité par David [36].
119. Mc Bain J. W., in Frontiers in Colloid Chemistry, 1 vol., 157 p., Interscience Inc. édit., 1950, ch. VI, pp. 133-154.
120. Mc Bain J. W., in Frontiers in Colloid Chemistry, 1 vol., 157 p., Interscience Inc. édit., N. Y., 1950, ch. V, pp. 113-131.

121. Mc Bain J. W., Colloid Science, 1 vol., 450 p., D. C. Heath & C°, édit., Boston, U. S., 1950.
122. Mc Bain J. W. & Green A. A., *J. am. chem. Soc.*, 1946, **68,** 1731-1736.
123. Mc Bain J. W. & Merrill R. C., *Ind. Eng. Chem.*, 1942, **34,** 915-919.
124. Mc Farlane, *Nature*, 1942, **149,** 439.
125. Machebœuf M., Th. Doct. ès Sc., Paris, 1928.
126. Machebœuf M., XII° Congrès International de Physiologie de Boston, août 1929.
127. Machebœuf M., Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique, 1 vol., Hermann édit., Paris, 1937.
128. Machebœuf M., *in* Polonovski M., *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1945, **5,** 71-104.
129. Machebœuf M. & Rebeyrotte P., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26,** 475-477.
130. Machebœuf M. & Sandor G., *C. R. Acad. Sc.*, 1932, **194,** 1102.
131. Machebœuf M. & Sandor G., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14,** 1168.
132. Machebœuf M. & Tayeau F., *C. R. Ac. Sc.*, 1938, **206,** 860.
133. Machebœuf M. & Tayeau F., *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129,** 1181.
134. Mc Leod, *Trans. Faraday Soc.*, 1934, **30,** 482.
135. Mc Leod D. B. & Wilson F. J., *Trans. Faraday Soc.*, 1935, **31,** 596.
136. Magnant C., Th. Doct. Sc., Paris, 1947.
137. Mark H., *J. Const. Soc. Amer.*, 1945, **16,** 183.
138. Masquelier J., Th. Doct. Sc., Bordeaux, 1948.
139. Matalon R., *Trans. Faraday Soc.*, 1950, **46,** 674-676.
140. Mathieu M., *Corps gras Savons*, 1943, **1,** 168-178.
141. Meng H. C. & Freemans, *J. Lab. clin. Med.*, 1948, **33,** 689.
142. Menkin V., *J. exptl. Med.*, 1936, **64,** 485.
143. Middlebrook G., Dubos R. J. & Pierce C., *J. exptl. Med.*, 1947, **86,** 175-184.
144. Mirimanoff A. & Bolle A., Festschrift Paul Casparis, 1949, pp. 149-153.
145. Mitchell J. W. & Linder P. J., *Bot. Gazette*, 1950, **112,** 126-129.
146. Morton H. J., Morgan J. H. & Parker R. C., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1950, **74,** 22-26.
147. Nageotte J., Morphologie des gels lipoïdes, 4 fasc., Hermann & C^ie^, édit., Paris, 1936.
148. Nègre L., *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, **49,** 319-331.
149. Nègre L., *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **109,** 1107.

150. Nègre L., Berthelot A. & Bretey J., *Ann. Inst. Pasteur,* 1937, **59,** 457.
151. Neuzil E., *J. Physiologie,* 1951, **43,** 833-836.
152. Neuzil E., Résultats inédits.
153. Neuzil E. & Canivenc R., *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1951, **33,** 993-997.
154. Neuzil E. & Jensen R., *C. R. Acad. Sc.,* 1953, **237,** 519.
155. Neuzil E. & Marquevielle J., *J. Physiologie,* 1950, **42,** 691-693.
156. Neuzil E., Tabone J. et Marquevielle J., *C. R. Acad. Sc.,* 1949, **229,** 600-602.
157. Neuzil E. & Talpin P., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux,* 1952, **90,** 123-130.
158. Neuzil E. & Tayeau F., Résultats non publiés.
159. Osborn A., U. S. P. 2.521.402; 5.9.50.
160. Pauling L., La nature de la liaison chimique et la structure des molécules et des cristaux, 1 vol. 430 p., Presses Universitaires de France, édit., Paris, 1949 (p. 287).
161. Payne T. P. B. & Duff G. L., *Arch. Path.,* 1951, **51,** 379-386.
162. Perlman L., Morton M. E. & Chaikoff J. L., *J. biol. Chem.,* 1941, **139,** 434.
163. Perrault M., *Presse méd.,* 1950, **58,** 1010-1012.
164. Pierce C., Dubos R. J. & Middlebrook G., *J. exptl. Med.,* 1947, **86,** 159.
165. Piffault C., Blanquet P. & Quéré J., *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux,* 1951, **89,** 69.72.
166. Pollet L., Gaultier M. & Fournier E., *Arch. Mal. prof.,* 1951, **12,** 196-200.
167. Polonovski J., Th. Doct. ès Sc., Paris, 1949.
168. Polonovski M., Baudu L. & Neuzil E., *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1947, **29,** 958-967.
169. Polonovski M., Baudu L. & Neuzil E., *Le lait,* 1949, **19,** 1-19, 128-140.
170. Polonovski M., Baudu L., Robert M. & Robert L., *Bull. Soc. Chim. biol.,* 1950, **32,** 855-861.
171. Polonovski M., Neuzil E., Baudu L. & Polonovski J., *C. R. Soc. Biol.,* 1947, **141,** 460-462.
172. Powell H. M., *Endeavour,* 1950, **9,** 154-158.
173. Prudhomme R. O. & Grabar P., *Journ. Chim. Phys.,* 1949, **46,** 667-670.
174. Putnam F. W., *Adv. Prot. Chem.,* 1948, **4,** 79-122.
174 bis. Read B. E., *J. biol. Chem.,* 1919, **37,** 121.
175. Richter C. P. & Barelare B. J., *Endocrinol.,* 1938, **23,** 15.
176. Richter C. P. & Eckert J. F., *Endocrinol.,* 1938, **22,** 214.
177. Rideal E. K., *Endeavour,* 1945, **4,** 83-90.
178. Riddle O., *J. exptl. Zool.,* 1910, **8,** 163.
179. Rigdon R. H., *Fed. Proc.,* 1949, **8,** 366.

180. Ripert J., *Corps gras Savons*, 1943, **1**, 143-145.
181. Sannie Ch., in Polonovski M., *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1948, **9**, 175-223.
182. Sattler T. H. & Youmans G. P., *J. Bact.*, 1948, **56**, 235-243.
183. Schmidt G., *Z. phys. Chem., A.*, 1940, **186**, 113-128.
184. Scholler, Brevet allemand n° 534.326, 1929.
185. Schulman J. & Matalon R., *Trans. Faraday Soc.*, 1947, **43**, 479.
186. Schulman J. & Rideal E. K., *Proc. roy. Soc.*, 1937, B, **122**, 29-46.
187. Schwartz A. M. & Perry J. W., Surface active agents, their chemistry and technology. 1 vol., 579 p., Interscience Inc. édit., New-York, 1949.
188. Simer P. H., *Anat. Rec.*, 1948, **101**, 333.
189. Sisley J. P., Index des huiles sulfonées et détergents modernes, 1 vol., 549 p., Teintex édit., Paris, 1949.
190. Sitowski, *Bull. intern. Acad. Sc. Cracovie*, 7 juillet 1905.
191. Smith C. R., Nishihara H., Golden F., Hoyt A., Buss C. O., Kloetzel M. C., *Public Health Reports*, 1950, **65**, 1588-1600.
192. Smyth H. F. Jr, Carpenter C. P. & Shaffer C. B., *J. am. pharm. Assoc.*, Sc. Ed., 1945, **34**, 172.
193. Smyth H. F. Jr, Carpenter C. P. & Shaffer C. B., *J. am. pharm. Assoc.*, Sc. Ed., 1947, **36**, 157.
194. Sollmann T. H. & Hanzlik P. J., Fundamentals of experimental Pharmacology, W. Stacey Inc. San Francisco, 1939.
195. Solotorovsky M. & Gregory F. J., *Amer. Rev. Tuberc.*, 1952, **65**, 718-721.
196. Soulairac A., *Bull. biol.*, 1947, **81**, 273-432.
197. Stanley W. M., Coleman C. H., Green C. M., Sacks J. & Adams R., *J. Pharmacol. exptl. Therap.*, 1932, **45**, 121.
198. Suby H. I., Albright F., Wayne J. & Dempsey E., *J. Urology*, 1951, **66**, 527.
199. Süllmann, *Experientia*, 1948, **4**, 35-36.
200. Szalay A., *Z. phys. Chem.*, A., 1933, **164**, 234-240.
201. Tayeau F., Th. Doct. ès Sc., Bordeaux, 1939.
202. Tayeau F., *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 575.
203. Tayeau F., *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 239.
204. Tayeau F., *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 240.
205. Tayeau F., *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 700.
206. Tayeau F., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1944, **26**, 287.
207. Tayeau F., Th. Doct. Méd. Bordeaux, 1944.
208. Tayeau F., *Ann. Biol. clin.*, 1950, **8**, 602.
209. Tayeau F. & Neuzil E., *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 79-80.
210. Thieme E., *Phys. Z.*, 1938, **39**, 384.
211. Thomas L. & Stetson C. Jr, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1948, **69**, 409.

212. Tomarelli R. M., Charney J. & Bernhart F. N., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1946, **63**, 108-110.
213. Trim A. R. & Alexander A. E., *Symp. Soc. exptl. Biol.*, 1949, **3**, 111-142.
214. Troteanu V. C., *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **102**, 145.
215. Valko E. I., *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 1946, **46**, 451-478.
216. Veldstra H., *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 594-622.
217. Villedieu A. M., Th. Doct. Pharm., Toulouse, 1939.
218. Virchow R., *Virchow's Arch. Path. Anat. Phys.*, 1854, **6**, 562.
219. Ward M. K., *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, 1948, **67**, 527-528.
220. Ward W. C., *J. am. pharm. Assoc.*, Sc. Ed., 1950, **39**, 265.
221. Williams R. W., *Soap sanit. Chemicals*, 1950, **26**, 117, 119, 121.
222. Winsor P. A., *Trans. Faraday Soc.*, 1948, **54**, 455-459.
223. Winsor P. A., *Trans. Faraday Soc.*, 1948, **54**, 459-463.
224. Wyatt, *Trans. Faraday Soc.*, 1929, **25**, 43.
225. Yong P. T., *J. comp. Psychol.*, 1946, **39**, 139.
226. Zellhoefer G. F. & Copley M. J., *J. am. chem. Soc.*, 1938, **60**, 1343-1345.
227. Zellhoefer G. F., Copley M. J. & Marvel C. S., *J. am. chem. Assoc.*, 1938, **60**, 1337-3343.
228. Zilberstein G., *Bull. Soc. chim. France*, 1951, pp. 33 D-38 D.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION. — « DES SAVONS AUX TWEENS » 5
Les substances superficiellement actives non ionisées .. 8
Les dérivés polyoxyéthyléniques d'esters gras d'anhydride de sorbitol 14

PREMIÈRE PARTIE

Recherches expérimentales sur les propriétés physicochimiques des tweens

CHAPITRE PREMIER. — LA STABILITÉ DES TWEENS ET DE LEURS SOLUTIONS 23
I. — Dissolution des tweens dans l'eau. Influence de la température 23
II. — Influence de la concentration saline sur les solutions 25
III. — Conservation des solutions aqueuses de tweens.. 28
IV. — Action des ultrasons sur le tween 20 30
Conclusions du chapitre premier 33

CHAPITRE II. — LES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES OBTENUES AVEC LES TWEENS 34
I. — Phénomènes de solubilisation 35
A. — Solubilisation en milieux aqueux 35
Solubilisation du cholestérol 35
Solubilisation des hydrocarbures 42
Solubilisation des alcools et des phénols 44
Solubilisation des acides et des esters 48

Pages

B. — Solubilisation en milieu hydroalcoolique..... 49
Solubilisation comparée des alcools et des phénols. 49
1° Solubilisation du menthol 50
a) En milieu hydroéthanolique 50
b) En milieu hydrométhanolique 57
2° Solubilisation du thymol 59
a) En milieu hydroéthanolique 59
b) En milieu hydrométhanolique 64
3° Solubilisation de divers phénols 66
Solubilisation comparée de composés halogénés.. 67
Solubilisation comparée de composés à chaîne linéaire 71
1° Solubilisation hydroéthanolique de l'alcool *n*-octylique 72
2° Solubilisation hydroéthanolique du méthyl-*n*-hexyl-carbinol 74
3° Solubilisation hydroéthanolique de l'acide *n*-caprylique 75
4° Solubilisation hydroéthanolique du bromo-2-octane 76
5° Solubilisation hydroéthanolique de l'octane normal 77
C. — Conclusions. Le pouvoir solubilisant des tweens. 78

II. — Formation de figures myéliniques 80
A. — Gonflement des esters gras d'anhydrosorbitol *(spans)* 81
B. — Gonflement des tweens non hydrosolubles 83
C. — Gonflement des associations moléculaires tweens hydrosolubles - substances non hydrosolubles 87
D. — Conclusions 90

III. — Associations moléculaires avec des détergents ionisés 90
A. — Inhibition par les tweens de la formation des figures myéliniques dans le système cholestérol - laurylsulfate de sodium 91
B. — Augmentation de la solubilité de certains agents actifs ionisés par les tweens 91
C. — Inhibition par les tweens de la précipitation mutuelle des substances superficiellement actives anioniques et cationiques 93

Pages

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales sur les propriétés biologiques des tweens

CHAPITRE PREMIER. — TOXICITÉ DES TWEENS 99
I. — Toxicité des tweens pour la Daphnie 99
A. — Protocole expérimental 100
B. — Résultats 100
II. — Toxicité pour l'embryon de Poulet 105
III. — Pouvoir hémolytique des tweens 107
A. — Hémolyse *in vivo* 107
B. — Hémolyse *in vitro* 108
C. — Discussion des résultats 110
IV. — Action sur la perméabilité capillaire 111
V. — Discrimination gustative des différents tweens par le Rat blanc 113
A. — Technique utilisée 114
B. — Résultats obtenus 115
C. — Interprétation 116
VI. — Action des tweens sur la germination des graines. 118
A. — Action des tweens sur la germination de la graine de Pin maritime 120
B. — Action des tweens sur la germination de la graine de Haricot 122
Conclusions du chapitre premier 126

CHAPITRE II. — ETUDE BIOLOGIQUE DES ASSOCIATIONS MOLÉCULAIRES OBTENUES AVEC LES TWEENS 127
I. — Coloration vitale des lipides du tissu adipeux par le noir Soudan 128
A. — Difficultés de la coloration vitale 128
B. — Utilisation des tweens 129
C. — Préparation des pseudosolutions aqueuses de noir Soudan 130
D. — Coloration vitale des lipides par voie parentérale 131
II. — Toxicité des associations moléculaires avec les substances superficiellement actives ionisées 133

Pages

A. — Toxicité des mélanges agents cationiques-tweens pour la Daphnie 134
B. — Toxicité des mélanges laurylsulfate de sodium-tween pour la Daphnie 137
C. — Toxicité des mélanges laurylsulfate de sodium-tween pour le Rat 140
III. — Extraction du cholestérol sérique 141
A. — Protocole expérimental 142
B. — Résultats. — Interprétation 143
Conclusions du chapitre II 146

Chapitre III. — Etude particulière de certains tweens... 147
I. — Tween 80 et tuberculose expérimentale du Cobaye. 147
A. — Protocole expérimental 149
B. — Résultats. — Interprétation 149
II. — Etude d'un dérivé iodé du tween 80 154
A. — Préparation d'un dérivé iodé du tween 80. 154
B. — Préparation d'un dérivé iodé du tween 80 marqué avec ^{131}I 155
C. — Etude biologique du iodotween 155
Conclusions du chapitre III 157

Conclusions générales 159

Bibliographie 163

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

LA THYROÏDE ; PHYSIOLOGIE ET BIOGÉNÈSE DE SON HORMONE

Vu et approuvé,
Bordeaux, le 3 octobre 1952.
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Signé : G. BRUS.

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 6 octobre 1952.
Le Recteur de l'Académie de Bordeaux,
Signé : E. DELAGE.